

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

CONTRIBUTION

à l'étude de la purification
des Hémolysines, par application
de leurs propriétés physico-chimiques

THÈSE pour l'obtention du Diplôme de
Docteur de l'Université de Paris

présentée devant la Faculté de Pharmacie de Paris

par

E. FROIDEVAUX

Pharmacien, Ancien Interne des Hôpitaux de Paris.

JURY :

MM. TASSILLY, *Président*

GUERBET, *Professeur*

FABRE, *Agrégé.*

MCMXXX



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Contribution à l'étude de la purification
des Hémolysines, par application
de leurs propriétés physico-chimiques

UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE PHARMACIE

CONTRIBUTION

à l'étude de la purification
des Hémolysines, par application
de leurs propriétés physico-chimiques

THÈSE pour l'obtention du Diplôme de
Docteur de l'Université de Paris

présentée devant la Faculté de Pharmacie de Paris

par

E. FROIDEVAUX

Pharmacien, Ancien Interne des Hôpitaux de Paris.

JURY :

MM. TASSILLY, *Président*

GUERBET, *Professeur*

FABRE, *Agrégé.*

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. ✱, ✎ I.
 PERROT, *Assesseur*, O. ✱, ✎ I.
 G. DURSENT, *Secrétaire*, ✱, ✎ I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. ✱, ✎ I.	Cryptogamie et Microbiologie
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. ✱, ✎ I.	Chimie organique
PERROT, O. ✱, ✎ I.	Histoire naturelle des médicaments
COUTIERE, O. ✱, ✎ I.	Zoologie
GRIMBERT, ✱, ✎ I.	Chimie biologique
LEBEAU, O. ✱, ✎ I.	Pharmacie chimique
DELEPINE, O. ✱, ✎ I.	Hydrologie et Hygiène
GUERBET, ✱, ✎ I.	Toxicologie
BOUGAULT, ✱, ✎ I.	Chimie analytique
GORIS, ✱, ✎ I.	Pharmacie galénique
GUÉRIN, ✱ ✎ I.	Botanique générale
TASSILLY, ✱, ✎ I.	Physique
DAMIENS, ✱, ✎ I.	Chimie minérale

Professeur honoraire : A. VILLIERS, ✱, ✎ I.

CHARGES DE COURS

MM. N.	Minéralogie
Marc HONNORAT, ✱, ✎ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques
LUTZ, ✱, ✎ I.	Cryptogamie

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, *, ⅃ I.
LUTZ, *, ⅃ I.
LAUNOY, *, ⅃ I.
HÉRISSEY, *, ⅃ I.
DELABY, *, ⅃ A.

MM. PICON, ⅃ I.
FABRE, ⅃ A.
MASCRE, ⅃ I.
FLEURY, ⅃ I.
BACH, ⅃ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, *, ⅃ I. Chimie générale
SOMMELET, *, ⅃ I., FABRE, ⅃ A. : *agrégés*,
chargés des travaux de Chimie analytique
SOUÈGES, ⅃ I. Microbiologie
LEROUX, ⅃ I. Physique
DEVAL, ⅃ I. Micrographie
HÉRISSEY, *, ⅃ I., DELABY, * A., et PICON, ⅃ I. :
agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.
Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ⅃ I.

A MA FEMME

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A Monsieur le Professeur TASSILLY
professeur de Physique à la
Faculté de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
qui a bien voulu nous faire l'honneur
de présider cette thèse.

A Monsieur le Professeur GUERBET,
Professeur de Toxicologie à la Faculté
de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

en témoignage de respectueux sentiments et de profonde reconnaissance pour la bienveillante sympathie avec laquelle il a bien voulu faire partie de notre jury.

A Monsieur R. FABRE, Professeur
agrégé à la Faculté de Pharmacie de
Paris, pharmacien des Hôpitaux de Paris,

en remerciements sincères pour les
conseils éclairés qu'il n'a cessé de
nous prodiguer au cours de notre
travail.

A Monsieur H. PENAU,
directeur scientifique des établissements Byla,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
dont la bienveillance a mis à notre
disposition les moyens de travail.

A Monsieur H. SIMONNET,
professeur-agrégé à l'Ecole Vétérinaire
d'Alfort,
dont les conseils nous ont toujours
guidés.

INTRODUCTION

L'Hémolyse consiste essentiellement dans la destruction des globules rouges ou hématies. Cette destruction met en liberté l'hémoglobine tandis que les substances protéiques lui servant de soutien se dissolvent ou se déposent.

I. — CAUSES DE L'HEMOLYSE :

L'Hémolyse est un phénomène très général.

La variation de concentration des sels en solution, un léger changement de réaction dans le sens de l'acidification ou de l'alcalinisation, sont par exemple autant de causes susceptibles de détruire les hématies au sein même de leur suspension. Ces réactions sont d'ordre physico-chimique ; elles se rattachent d'une façon générale à toutes les ruptures d'équilibre qui déterminent la destruction d'un tissu vivant quelconque ou d'une cellule organisée et doivent être étudiées comme telles.

Mais il est d'autres causes capables de déterminer une hémolyse d'un ordre différent. Les saponines, la quinine (1), la digitonine (2), la lysocithine (3), par exemple, font penser à un phénomène chimique.

L'hémolyse que nous appelons physiologique, enfin, est due à certains sérums préparés. Un organisme ayant subi, *in vivo*, l'introduction de corps étrangers, d'hématies, en l'occurrence, voit apparaître dans son sérum certaines propriétés ou substances nouvelles nommées spécifiquement hémolysines. Elles sont destinées à détruire les hématies.

Pratiquement on prépare un tel sérum en injectant à un animal d'expérience A une suspension d'hématies d'une espèce déterminée B ; les doses, le nombre des injections et

leur intervalle sont soigneusement fixés. Le sérum de l'animal d'expérience A acquiert ainsi la propriété d'hémolyser les globules rouges de l'espèce employée B. C'est un sérum hémolytique.

II. — MECANISME DE L'HEMOLYSE :

1° *Ses facteurs :*

La formation d'un sérum hémolytique n'est que le cas particulier d'un phénomène beaucoup plus général mis en lumière par les travaux de Bordet et de Gengou en 1907 (4) : des corps étrangers ou antigènes (hématies, bactéries, toxines par exemple), introduits dans la circulation d'un animal, déterminent chez cet animal l'apparition de formation de défense ou anticorps. Ces anticorps, dont on ignore la nature, ont pour fonction de détruire l'antigène soit en l'hémolysant s'il s'agit d'hématies, soit en l'agglutinant si l'on a certaines bactéries, par exemple : tout sérum muni d'anticorps porte alors le nom d'immunsérum. L'anticorps ne peut d'ailleurs agir sur l'antigène sans la présence d'un troisième facteur spécifique qui existe dans tout sérum : l'alexine ou complément.

L'anticorps et l'alexine se distinguent nettement l'un de l'autre.

L'anticorps ou sensibilisatrice est thermostable et n'est altéré que vers 65°, il n'existe que dans les immunsérums. Il est de plus à peu près spécifique : il ne vaut que contre l'antigène qui lui a donné naissance et en tire même son nom : les hémolysines, par exemple, formées par l'antigène hématies, ne pourront détruire que des hématies. L'anticorps enfin ne trouve son activité maxima que contre les éléments de l'espèce qui lui a donné naissance ; des hématies de chien ne seront hémolysées que par un immunsérum préparé à partir d'hématies de chien.

L'alexine ou complément est, au contraire, thermolabile et détruite à 45°.

De nature inconnue, comme l'anticorps, elle existe naturellement dans tout sérum. Elle n'est pas spécifique et peut « compléter » tout immunsérum.

Nous voyons donc, en résumé, que dans une hémolyse biologique, d'une part les deux facteurs hémolysants sont l'anticorps ou hémolysine et le complément ou alexine. L'élément hémolysable ou antigène, d'autre part, est le globule rouge de l'espèce qui a servi à préparer le sérum.

2° Processus de l'Hémolyse :

Ehrlich (5), puis Bordet (6), puis Danysz (7), ont étudié les interractions des complexes antigène-anticorps (toxine-antitoxine) et ont déterminé les proportions suivant lesquelles se produit leur neutralisation. Bordet et Gengou démontrèrent que la réaction hémolytique se fait en deux temps :

A. Formation du complexe antigène-sensibilisatrice.

B. Action du complément qui détermine l'hémolyse proprement dite.

On peut traduire la marche d'une hémolyse par une courbe en fonction du temps et de l'hémoglobine libérée. MM. Fabre et Simonnet (8) au cours de travaux que nous rappellerons plus loin en détail établirent cette courbe avec précision au moyen de la spectro-photométrie.

3° Conditions optima d'une hémolyse :

Pour s'accomplir suivant ce processus normal l'hémolyse a besoin d'un certain milieu.

Le phénomène hémolytique ne se ramène pas, nous l'avons vu, à une question d'équilibre osmotique. Est-ce à dire que les électrolytes qui, en osmose, jouent le rôle que l'on sait, n'ont aucune influence sur les hémolyses biologiques ? C'est la question que se posèrent MM. Piettre et Vila. Leurs travaux, parus en 1906 (9), mirent au point l'action sur l'hémolyse de divers électrolytes en solutions isotoniques. Tout électrolyte est loin d'agir de même. Tandis que servait de témoin l'hémolyse obtenue en solution de chlorure de sodium à 8 p. 1.000 la réaction était sensiblement retardée et parfois nulle en présence d'iodure de potassium, ne s'accomplissait que rarement avec le bromure de potassium ; avec le sulfate de sodium et le sucre l'hémolyse ne s'accomplissait jamais.

Plus tard, M. Piettre, poursuivant son étude, publiait, en collaboration avec M. Chrétien (10), le résultat de ses recherches concernant l'action sur l'hémolyse d'une solution de chlorure de sodium en concentration variable. D'une façon générale l'hémolyse, optima au point isotonique de 8 p. 1.000 est entravée à mesure que croît la concentration en Na Cl, jusqu'à concurrence d'une proportion de 15 p. 1.000 où elle devient nulle. Au-dessous d'une concentration de 8 p. 1.000 l'hémolyse est favorisée, mais alors c'est le déséquilibre osmotique qui agit, la réaction ayant lieu sans addition de complément.

III. — ESSAI DE LOCALISATION DU POUVOIR HEMOLYTIQUE D'UN SERUM :

Depuis les découvertes de Bordet, de nombreux auteurs, par les procédés les plus divers ont cherché à isoler les anticorps des immunsérums.

Rapidement on s'aperçut que la substance ou propriété hémolytique était fixée sur les protéines du sérum. Il s'agissait donc pratiquement d'isoler ces protéines.

Composition d'un sérum

Au point de vue chimique le sérum sanguin se compose de 7 à 9 p. 1.000 de sels minéraux, de 1.50 p. 1.000 de glucides, de petites quantités de matières azotées telle que l'urée, l'acide urique et enfin, partie qui nous intéresse plus particulièrement, de 70 à 80 p. 1.000 de substances protéiques.

Les protéines du sérum ont les propriétés générales de toutes les matières albuminoïdes. Ces substances coagulent par la chaleur, se transforment en syntonines par action des acides ou des alcalis et donnent les trois réactions classiques du biuret, de Millon et xanthoprotéique.

Enfin elles flocculent à leur point isoélectrique.

On sait que les protéines se comportent comme des colloïdes amphotères formant avec les acides et les bases des sels définis mais incapables de se combiner à la fois avec un anion et un cation. La combinaison avec l'un ou

avec l'autre dépend de la réaction de la solution prise à partir d'un point où les protéines ne se combinent ni à l'anion ni au cation : c'est là le point isoélectrique. C'est à ce point isoélectrique, point de moindre stabilité des colloïdes, que se fera la floculation optima de ces protéines. Cependant, lorsqu'il s'agit d'une solution de sérine, par exemple, la floculation ne se produit pas d'elle-même, au point isoélectrique, 4,7. La sérine appartient, en effet, au groupe des substances albuminoïdes dont le degré de dispersion est encore très marqué au point isoélectrique. Mais si l'on ajoute un électrolyte comme le chlorure de sodium, la précipitation a lieu d'une façon complète si toutefois la concentration du sel est suffisante.

D'après l'hypothèse de Loeb (11) la différence de potentiel entre le solvant et les particules colloïdales empêche ces dernières de s'agglomérer. L'addition du sel diminuant cette différence de potentiel détermine ainsi la floculation.

Ces propriétés générales nous servent à distinguer pratiquement les deux constituants protéiques essentiels du sérum :

1. *La sérine.* — Point isoélectrique 4,7, soluble dans l'eau distillée neutre, ne précipite pas le sulfate de magnésie en milieu neutre.
2. *La globuline.* — Deux points isoélectriques, l'un entre 4,5 et 5 et l'autre entre 5,3 et 5,5. Soluble dans l'eau seulement si le milieu contient des sels neutres ou s'il est légèrement alcalin, précipitée entièrement par le sulfate de magnésie à froid et sans acidification.

Le double point isoélectrique de la globuline a été déterminé par Riener en 1927 (12). Il est vrai qu'antérieurement Sörensen (13) avait reconnu l'existence de deux sortes de globulines : l'euglobuline insoluble dans l'eau distillée et la pseudoglobuline au contraire soluble. Comme on le voit par ce dernier point il est assez délicat de distinguer sérine et globuline.

Pratiquement dans nos essais nous appellerons *sérines* les protéines solubles dans l'eau distillée et ne précipitant pas par le sulfate de magnésie, et *globulines* les protéines ne se dissolvant qu'à la faveur d'alcalinisation et précipitant par le sulfate de magnésie: nous adopterons le pH 5,4 comme point isoélectrique de la globuline.

Les premiers travaux furent effectués sur les sérums thérapeutiques antitoxiques, partageant avec les sérums hémolytiques le privilège d'être pourvus de sensibilisatrice. Il s'agissait d'obtenir avec le minimum de protéines le maximum d'anticorps.

Le premier effort fut tenté par Gibson en 1906 qui, à cet effet, mit à profit une technique plutôt physique que chimique: la méthode aux sels de l'école allemande. Ces auteurs, rompant l'équilibre colloïdal des protéines d'un sérum, les précipitaient par l'addition de sels neutres; le sulfate de soude, de magnésie, ou d'ammoniaque, le chlorure de sodium, par exemple, furent successivement préconisés par les uns et les autres. A quelque sel que l'on s'adressât, la technique générale était sensiblement la même: la solution saline concentrée était additionnée au sérum par quantités fractionnées et déterminait par là même des précipitations successives; la précipitation était complète lorsqu'on avait atteint un taux de 30 p. 100 de Na Cl.

D'après les auteurs allemands, la première addition de sels provoque un faible précipité de protéines constituant « l'euglobuline », une concentration plus forte provoque la précipitation d'une masse plus considérable, la pseudoglobuline. Dans la liqueur, et ne précipitant par aucune nouvelle addition de sel, reste la sérine.

C'est à l'aide de cette méthode que Gibson fit ses expériences sur des sérums antitoxiques. Il retrouva l'antitoxine dans la pseudoglobuline, en proportion d'ailleurs assez irrégulière, la sérine ne se montrant que peu intéressante à cet égard. Néanmoins, il put tirer partie de la méthode et préparer des sérums concentrés ou purifiés.

Un point délicat cependant restait à préciser : il était intéressant d'identifier les précipités obtenus. Dans un tel fractionnement que devenaient les constituants classiques du sérum : sérine et globuline ? Ces protéines avaient, en effet, dès cette époque, droit de cité : leurs propriétés particulières et définies leur avaient donné une existence reconnue.

L'identité officielle de ces protéines couvrirait-elle l'euglobine, la pseudoglobine et la sérine des auteurs allemands ? Des recherches menées ultérieurement par M. Piettre (1923) (14), montrèrent qu'on n'est pas là en face de véritables entités chimiques. Les classifications sont arbitraires et ne sauraient s'appliquer qu'à des mélanges des divers protéiques du sérum. Mieux vaudrait, pour désigner les produits obtenus, remplacer ces dénominations par une fiche de renseignements indiquant l'ordre des précipitations salines en fonction de teneurs en sels, de la température, de la réaction.

Utilisant, lui aussi le chlorure de sodium, mais suivant une technique différente, Frouin (15), en 1908, s'attaqua à la purification des sensibilisatrices, en l'espèce de l'hémolyse. Le sérum hémolytique était d'abord saturé de chlorure de sodium puis dialysé contre une solution de chlorure de sodium à 9 gr. 4 p. 1.000. Le liquide de dialyse ne contenait que la sensibilisatrice.

Plus différent encore des précédents était le procédé que, vers la même époque, deux chimistes allemands, Liebermann et von Fenyvessy (16), tentèrent de mettre au point.

S'inspirant des conclusions de Bordet et de Gengou concernant le mécanisme de l'hémolyse, ils mirent à profit la fixation de l'anticorps sur l'antigène pour obtenir l'hémolyse par destruction des hématies sensibilisées. Des globules rouges de porc étaient mis en présence de sérum hémolytique de lapin antiporc et portés ainsi à 37° pendant 3/4 d'heure. Les hématies étaient ensuite centrifugées, lavées et traitées par une petite quantité de HCl N/100 jusqu'à ce qu'une légère coloration brune indiquât la destruction des

tissus. La liqueur neutralisée par NaOH N/100 après traitement à l'éther contenait la sensibilisatrice.

Watson et Wallace (17), puis Sedallian et Mlle Gaumond (18) et, enfin tout dernièrement, Leulier, Sedallian et Mme Clavel (19) précipitèrent la toxine diphtérique par abaissement du pH. On peut admettre un certain parallélisme entre les propriétés de la toxine et celles de l'hémolysine.

Travaillant sur des sérums hémolytiques MM. Piettre et Chrétien, mirent au point une méthode de précipitation des protéines sériques déjà employée par Fournier en 1915 (20). Nous ne décrirons pas ici le procédé, nous proposant d'en faire ultérieurement une étude critique.

Disons seulement qu'il différait absolument des précédents en ce sens qu'il faisait appel à des produits organiques, acétone et éther, pour précipiter et purifier les protéiques du sérum.

Tous ces essais, tentés à la suite des travaux de Bordet et de Gengou, pour isoler ou purifier les anticorps qu'ils avaient découverts, eurent au moins le résultat de localiser les anticorps dans les diverses fractions du sérum. Si dans les sérums antitoxiques, les antitoxines accompagnent la sérine, dans les sérums agglutinants, les agglutinines sont liées à la globuline, mais dans les sérums hémolytiques, l'hémolysine est fixée sur la sérine.

Partant de ces résultats nous avons cherché à concentrer l'activité hémolytique d'un sérum sur une quantité minima de substances protéiques. Il s'agissait donc d'abord d'extraire du sérum les protéines servant de substratum à l'hémolysine, puis de séparer ces protéines et de concentrer l'hémolysine sur l'une d'elle. A l'aide de méthodes physiques et chimiques, nous eûmes recours à des précipitations des substances protéiques du sérum.

Par ces directives générales, ces recherches peuvent se rapprocher du travail de M. Plé, accompli dans ce même laboratoire. Des méthodes parallèles furent mises en jeu pour concentrer d'une part l'activité fermentaire de la

pepsine et de l'autre l'activité hémolytique d'un immun-sérum.

*
* *

Nous avons divisé notre travail en 3 chapitres :

Chapitre I. — Technique d'hémolyse et allure générale du phénomène.

Chapitre II. — Essai de concentration de l'activité hémolytique par la méthode à l'acétone.

1°) Précipitation acétonique des protéines totales du sérum.

2°) Pouvoir hémolytique des produits ainsi obtenus.

3°) Séparation de la globuline et de la sérine : étude de leur activité hémolytique.

4°) Essais tentés pour obtenir une sérine sèche hémolytique.

Chapitre III. — Essai de concentration de l'activité hémolytique par précipitation par quelques électrolytes au point isoélectrique.

1°) Essai au chlorure de sodium.

2°) Essai au chlorure de lithium.

*
* *

Nous remercions Monsieur le Professeur Tassilly de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider notre thèse et Monsieur le Professeur Guerbet qui a bien voulu faire partie du jury.

Nous devons tout particulièrement exprimer notre reconnaissance à Monsieur le Professeur agrégé Fabre, pharmacien en chef du groupe hospitalier Necker-Enfants Malades, qui nous a indiqué ce sujet de recherches. Ses conseils prodigués au cours de trois années d'un internat accompli dans son service, nous ont dirigé dans l'ensemble de notre travail et facilité notre tâche.

Nous prions M. Péneau, docteur ès-sciences, directeur scientifique des Etablissements Byla, de recevoir ici l'expression de nos vifs remerciements. La bonté avec laquelle il nous accueillit en son laboratoire d'études, sa bienveillance et ses conseils éclairés ont toujours été pour nous de précieux encouragements.

Enfin, nous ne saurions assez dire toute notre reconnaissance à M. Simonnet, professeur agrégé à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, qui nous a guidés dans notre tâche quotidienne. Son ardeur pour la recherche scientifique, ses conseils et ses directives de tous les instants ont été pour nous un exemple et un appui. Qu'il veuille bien trouver ici nos remerciements pour avoir bien voulu joindre à ses préoccupations scientifiques considérables le soin de nous aider à mener à bien ce modeste travail.

CHAPITRE PREMIER

Technique d'Hémolyse et marche générale du Phénomène

1. — *Technique d'Hémolyse.*

Pour l'étude de ces questions d'hémolyse, il est nécessaire d'avoir en main une méthode sûre et précise.

Les conditions et la marche générale d'une hémolyse physiologique sont classiques. Toutefois, la nécessité de comparer entre eux les pouvoirs hémolytiques de diverses substances entraîne celle de déterminer une technique toujours semblable à elle-même dans ses détails.

Anticorps, alexine, antigène, tels sont les éléments de l'hémolyse qu'il faut préparer.

L'hémolysine est régulièrement fournie par du sérum de lapin anti-chien. Le lapin d'expérience reçoit une injection intrapéritonéale de 3 cm³ d'une suspension d'hématies de chien, lavées 5 fois à l'eau salée et ramenées au volume de sang initial par de l'eau salée à 8 p. 1.000. L'opération est répétée 6 fois à 5 jours d'intervalle; au bout d'un mois environ l'animal est sacrifié, son sang recueilli aseptiquement à la carotide. Le sérum, ainsi sensibilisé aux hématies de chien, après séparation du caillot est réparti en tubes scellés. Le complément est détruit par chauffage 20 minutes à 56° au bain-marie.

Un sérum hémolytique, ainsi préparé, est de conservation très satisfaisante à la glacière.

L'alexine ou complément existe naturellement dans tous les sérums, en quantité variable toutefois, selon l'espèce.

Le sérum de cobaye contient du complément en quantités appréciables: chez cet animal une ponction cardiaque peut sans inconvénient donner 2 cm³ à 3 cm³ de sang selon le poids de l'animal.

Le sérum de cobaye recueilli par coagulation et centrifugation est dilué au $\frac{1}{2}$: de cette façon l'hémolyse rendue moins brutale peut être suivie plus aisément selon la quantité d'hémolysine mise en œuvre.

Il faut noter aussi que le pouvoir complémentaire s'altérant très rapidement in vitro, nous avons toujours soin de ne prélever qu'extemporanément le sérum de cobaye, utilisable en 2 heures.

L'antigène, enfin, nécessité par la spécificité de l'hémolysine est constitué par des hématies de chien. Le sang prélevé par ponction cardiaque, défibriné, est centrifugé. Le culot de globules est lavé 5 fois à l'eau salée à 8 p. 1.000 de chlorure de sodium et ramené au volume de sang initial. Cette suspension est elle-même diluée au $\frac{1}{20}$ à l'aide d'eau salée à 8 p. 1.000.

Contrairement au sérum complémentaire, la suspension d'hématies peut se conserver longtemps, à la condition d'être constamment placée à la glacière.

Un point important est de fixer la proportion de ces divers éléments capables de produire une hémolyse susceptible d'être mesurée. Le problème se pose ainsi: étant donné une quantité fixe d'antigène et de sensibilisatrice, quelle quantité maxima de sérum hémolytique faut-il employer pour produire une hémolyse au bout d'un temps appréciable et quelle quantité minima du même sérum produit une hémolyse encore sensible au bout du temps d'expérience? Entre ces deux limites une dilution décroissante permettait de suivre l'hémolyse et d'en apprécier la vitesse, proportionnelle évidemment au pouvoir hémolytique du sérum et des produits ultérieurement étudiés.

Nous employons toujours une quantité fixe d'antigène et de complément: 1 cm³ du premier et $\frac{1}{10}$ cm³ du second,

sans nous préoccuper de leur activité respective qui, on le sait, peut varier suivant les suspensions d'hématies et les sérums.

En effet, les expériences sont toujours menées comparativement et simultanément sur le produit initial et ses dérivés : le titre de l'antigène et du complément n'intervient donc pas.

Nos expériences se ramènent ainsi à un simple titrage de pouvoir hémolytique des produits essayés.

Des sérums hémolytiques, préparés comme il a été dit plus haut, ont été l'objet de nos premiers essais.

D'une façon générale, l'essai hémolytique est pratiqué de la façon suivante :

On commence par préparer à partir du sérum pur et à l'aide d'eau salée à 8 p. 1.000, des dilutions décroissantes de produit hémolytique. Au début nous nous contentions d'échelons relativement espacés et on obtient ainsi des dilutions croissantes d'après le tableau suivant :

Sérum pur	eau salée à 8 ‰	dilutions obtenues
1/10 cm ³	1/10 cm ³	1/2
1/10 cm ³	2/10 cm ³	1/3
1/10 cm ³	4/10 cm ³	1/5
1/10 cm ³	6/10 cm ³	1/7
1/10 cm ³	9/10 cm ³	1/10
1/10 cm ³ dilué au 1/2	9/10 cm ³	1/20
1/10 cm ³ dilué au 1/3	9/10 cm ³	1/30
1/10 cm ³ dilué au 1/5	9/10 cm ³	1/50

Nous portons ensuite dans une série de tubes à hémolyser 1/10 cm³ de chaque dilution et 1/10 cm³ de sérum pur dans le premier tube et dans le tube témoin.

La série entière reçoit alors 1 cm³ de suspension d'hématies de chien au 1/20, préparée comme il a été dit plus haut, puis 1 cm³ 8/10 d'eau salée à 8 p. 1.000 et 1 cm³ 9/10 pour le tube témoin. Cette dernière addition a pour but de porter le volume final à 3 cm³. Le tout est porté à l'étuve

à 37° pendant 1/2 heure : la sensibilisatrice se fixe alors sur l'antigène.

Au bout de ce temps optimum il convient d'ajouter dans tous les tubes sauf dans le témoin, le complément, 1/10 cm³ de sérum de cobaye fraîchement recueilli dilué au 1/2.

La quantité de sérum hémolytique pur contenu dans chacun de nos tubes correspond donc à :

1/10 cm ³	dans le tube N° 1	renfer.	1/10 cm ³	de sérum pur
1/20 cm ³	»	N° 2	»	1/10 cm ³ de sérum dilué au 1/2
1/30 cm ³	»	N° 3	»	1/10 cm ³ » 1/3
1/50 cm ³	»	N° 4	»	1/10 cm ³ » 1/5
1/70 cm ³	»	N° 5	»	1/10 cm ³ » 1/7
1/100 cm ³	»	N° 6	»	1/10 cm ³ » 1/10
1/200 cm ³	»	N° 7	»	1/10 cm ³ » 1/20
1/300 cm ³	»	N° 8	»	1/10 cm ³ » 1/30
1/500 cm ³	»	N° 9	»	1/10 cm ³ » 1/50

Après mélange (par renversement) les tubes sont reportés à l'étuve à 37° et l'hémolyse est suivie de quart d'heure en quart d'heure. L'expérience est considérée comme terminée au bout d'une heure (tableau II).

Tableau I. — Tubes à hémolyser :

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Témoin
Sérum hémolytique	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
	pur	au	au	au	au	au	au	au	au	pur
		1/2	1/3	1/5	1/7	1/10	1/20	1/30	1/50	
		1/20	1/30	1/50	1/70	1/100	1/200	1/300	1/500	
		sérum pur	sérum pur	sérum pur	sérum pur	sérum pur	sérum pur	sérum pur	sérum pur	
Suspension d'hématies	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Eau salée	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10
Sérum de cobayes	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³	cm ³
	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10

Titre du sérum hémolytique :

Nous pouvons dire que, pour des globules déterminés et en présence d'une quantité donnée d'alexine, un sérum hémolytique est de titre 1 lorsqu'il faut 1 cm³ de ce sérum pour hémolyser totalement en 1 heure 1 cm³ de suspension d'hématies au 1/20.

Il sera de titre 10 lorsqu'il faudra 1/10 cm³ de sérum pour obtenir ce résultat.

Et le titre sera ainsi proportionnel à une fraction d'un cm³ de sérum hémolytique.

D'après cette définition nous voyons dans le tableau II que les sérums employés sont de titre 50 (1).

Tableau II
Pouvoir hémolytique du sérum de lapin antichien.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
au bout de 15 m. (1)										
Sérum 1	H	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Sérum 2	H	H	O	O	O	O	O	O	O	O
au bout de 30 m.										
Sérum 1	H	H	O	O	O	O	O	O	O	O
Sérum 2	H	H	O	O	O	O	O	O	O	O
au bout de 45 m.										
Sérum 1	H	H	H	O	O	O	O	O	O	O
Sérum 2	H	H	H	O	O	O	O	O	O	O
au bout de 60 m.										
Sérum 1	H	H	H	H	O	O	O	O	O	O
Sérum 2	H	H	H	H	O	O	O	O	O	O

(1) Par la lettre H nous exprimons une hémolyse complète.

Le signe O indique une réaction négative.

La lettre h est réservée à l'hémolyse incomplète.

Le tableau II nous prouvait donc l'inutilité des dernières dilutions. Connaissant approximativement le taux du pouvoir hémolytique de nos sérums, il parut intéressant de nous fixer des dilutions plus serrées. Cette nouvelle échelle devenait par la suite d'autant plus nécessaire que nous allions traiter des produits de pouvoir hémolytique plus diminué.

Nous avons donc adopté, toujours à partir du sérum pur ou de son équivalent :

La dilution au $3/4$ en mélangeant $3/10$ cm³ de sérum pur et $1/10$ cm³ d'eau salée ;

La dilution au $1/2$ en mélangeant $1/10$ cm³ de sérum pur et $1/10$ cm³ d'eau salée ;

La dilution au $1/3$ en mélangeant $1/10$ cm³ de sérum pur et $2/10$ cm³ d'eau salée ;

La dilution au $1/4$ en mélangeant $1/10$ cm³ de sérum pur et $3/10$ cm³ d'eau salée ;

La dilution au $1/5$ en mélangeant $1/10$ cm³ de sérum pur et $4/10$ cm³ d'eau salée.

Ces dilutions correspondent d'après ce qui a été indiqué plus haut aux titres :

13,3	pour la dilution au $3/4$
20	« au $1/2$
30	« au $1/3$
40	« au $1/4$
50	« au $1/5$

Si, d'autre part, nous proposons que $1/1.000$ cm³ soit désigné par la lettre $\mathcal{L}$, nos dilutions correspondront respectivement à un volume de :

100 $\mathcal{L}$	pour le sérum pur	correspondant au titre 10
75 $\mathcal{L}$	pour le sérum dilué au $3/4$,	correspondant au titre 13
50 $\mathcal{L}$	pour le sérum dilué au $1/2$,	correspondant au titre 20
33 $\mathcal{L}$	pour le sérum dilué au $1/3$,	correspondant au titre 30
25 $\mathcal{L}$	pour le sérum dilué au $1/4$,	correspondant au titre 40
20 $\mathcal{L}$	pour le sérum dilué au $1/5$,	correspondant au titre 50

Ces dilutions sont entre elles comme les nombres 12, 9, 6, 4, 3, 2, 1.

Au début de l'expérience il n'est besoin que d'une appréciation relative et la raison de la progression est 3. Plus loin nous entrons dans la région où le taux de l'hémolyse se fixe, la progression est de raison 1, ce qui permet une précision plus grande.

Enfin, dans certaines hémolyses, nous avons cru pouvoir ajouter la dilution aux $2/3$ correspondant à 66 μ et au titre 15.

II. — Marche générale du phénomène hémolytique.

Effectuant des essais hémolytiques en série il paraît intéressant de déterminer l'allure générale du phénomène hémolytique en fonction du temps.

Cette détermination peut se faire à l'aide d'une courbe, obtenue en portant les temps en abscisses et en ordonnée la quantité d'hémoglobine passée en solution.

Au cours des recherches qui leur permirent en 1926 de suivre la marche du phénomène hémolytique (physique ou chimique), MM. Fabre et Simonnet (8) (22) (23) mirent au point un procédé à l'aide duquel ils dosèrent exactement l'hémoglobine passée en solution. Ils substituèrent au dosage du fer de l'oxyhémoglobine, long et délicat, un dosage de la matière colorante entrée en solution par spectrophotométrie, procédé plus sensible que la méthode de comparaison colorimétrique.

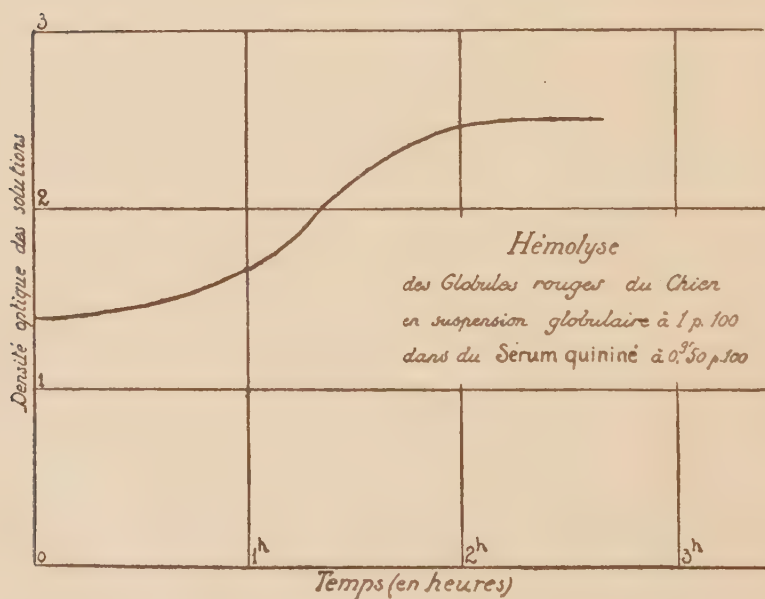
« Si au moyen du spectrophotomètre de Yvon, on détermine la densité optique d'une solution d'oxyhémoglobine, pour une radiation de longueur d'onde déterminée, par exemple celle correspondant au maximum d'absorption ($\lambda = 5769$ U.A) d'une des bandes de ce pigment, on constate qu'en faisant varier la dilution de la liqueur, les points obtenus pour la valeur de cette densité optique se placent sur une droite. On observe en somme, une variation linéaire de celle-ci en fonction de la concentration.

« D'autre part, comme les conditions de dilution varient
 « dans de faibles limites au cours de l'expérience, on n'a
 « pas à redouter un déplacement appréciable des bandes
 « de l'oxyhémoglobine. Enfin des mesures spectrophotomé-
 « triques sur des solutions témoins prouvent que l'oxyhé-
 « moglobine n'est pas altérée au cours de l'expérience.

« Si donc on veut suivre la marche d'une hémolyse sous
 « l'influence d'un facteur déterminé, il suffit de prélever
 « des volumes égaux de liquides à examiner, à des temps
 « donnés, de les centrifuger dans les mêmes conditions, et
 « de déterminer au spectrophotomètre la densité optique
 « des solutions limpides ainsi obtenues.

A l'aide de ce procédé MM. Fabre et Simonnet ont déterminé la courbe obtenue par l'hémolyse à globules rouges de chien mis en suspension à 1 % dans du sérum isotonique additionné de 0,50 % de chlorhydrate basique de quinine.

A l'examen de cette courbe on voit que l'hémolyse ne se



manifeste véritablement qu'au bout d'un certain temps : il y a un retard provenant d'une sorte de résistance des hématies : le cholestérol, d'après Mayer et Schaeffer (24) jouerait ici un rôle d'inhibition.

S'il s'agit au contraire d'une hémolyse d'ordre physique due à l'hypotonie, par exemple, la courbe est droite indiquant une destruction immédiate, continue et régulière des hématies.

A l'aide de cette même méthode on détermine la marche de l'hémolyse biologique due aux hémolysines. L'expérience est menée comparativement sur le sérum initial et sur la solution de protéines totales préparées par la méthode de l'acétone.

Dans deux séries de 7 tubes on porte dans chacun des tubes de la première 1/10 cc. de sérum dilué au 1/3.

Dans ceux de la seconde 1/10 cc. de solution de protéines diluée au 1/3.

On ajoute dans tous les tubes :

Solution d'hématies au 1/20	1 cc.
Eau salée à 7 ‰	8 cc.
	9 cc.

On porte une demi-heure à l'étuve à 36° puis on ajoute :

Sérum de cobaye dilué au 1/2 1/10 cc.

A ce moment on note l'heure exactement et l'on reporte à l'étuve à 36°.

Au bout de cinq minutes les hématies du tube 1 sont séparées par centrifugation (1) du liquide qui est recueilli.

Au bout de quinze minutes le liquide du tube 2 est recueilli et ainsi de 10 minutes en 10 minutes ce qui donne les temps de 5 minutes, 15, 25, 35, 45, 55, 65 minutes pour l'ensemble de l'expérience et pour chacun des tubes.

La solution d'hémoglobine de chacun des 7 tubes est

(1) Le temps de centrifugation est compris dans le temps d'expérience.

alors examinée au spectrophotomètre. On a alors les quantités suivantes d'hémoglobine :

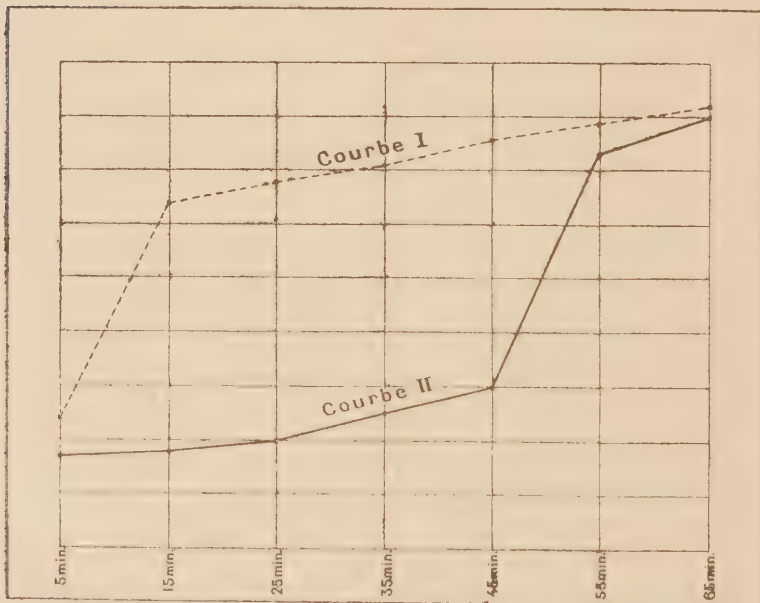
*Valeur relative d'hémoglobine libérée
exprimée en densité optique.*

Pour le tube	1	solution de protéines	1,7;	sérum initial	2,4
—	2	—	1,8;	—	6,4
—	3	—	2,0;	—	6,8
—	4	—	2,5;	—	7,1
—	5	—	3,0;	—	7,6
—	6	—	7,3;	—	7,9
—	7	—	8,0;	—	8,2

On a donc par rapport au temps les courbes suivantes qui indiquent que cette hémolyse physiologique ne devient vraiment effective qu'au bout d'un certain temps. Le phénomène ne peut d'ailleurs être vraiment apprécié que lorsque la dose d'hémolysine mise en œuvre n'est pas massive.

Hémolyse produite par un sérum hémolytique : courbe I.

*Hémolyse produite par une solution de protéines
hémolytiques : courbe II.*



CHAPITRE DEUXIÈME

Essai de concentration de l'activité hémolytique par la méthode de l'acétone

1. — *Précipitation acétonique des protéines totales du sérum.*

Cherchant à purifier la substance hémolytique d'un sérum nous nous sommes adressés d'abord à la méthode mise au point par MM. Piettre et Chrétien (25). Telle qu'elle avait été décrite, elle conduisait à des substances dont la présence est reconnue dans le sérum, sans passer par les classifications arbitraires des auteurs allemands signalées plus haut. L'acétone et l'éther, seuls réactifs employés, pouvaient être par la suite facilement et complètement éliminés et ne gênaient pas l'essai hémolytique qui devait suivre.

Il convient de n'employer que de l'acétone pur redistillé en présence d'huile à partir d'acétone déjà rectifié. L'éther qui doit servir à effectuer les lavages de précipités est, lui aussi, redistillé en présence d'huile à partir d'éther officinal anhydre.

Devant être rigoureusement dépourvus d'eau, l'acétone est conservé sur chlorure de calcium et l'éther sur sodium en petits flacons.

On ne doit employer ces produits qu'après s'être assuré qu'ils ne contiennent aucune impureté susceptible d'altérer les globules rouges mis en œuvre dans nos hémolyses.

Pour cela on évapore, dans des capsules de verre, 10 cm³ de chacun des solvants à essayer. Après n'avoir constaté aucun résidu sensible, on lave chaque capsule avec 2 cm³ d'eau salée à 8 p. 1.000. Les solutions servent ensuite à effectuer les dilutions au 1/2, au 1/3, au 1/5, auxquelles on ajoute hématies de chien et eau salée à 8 p. 1.000 dans les proportions indiquées plus haut et que nous rappelons :

Tubes	1	2	3	4	Témoin
Soluté du résidu d'évaporation d'éther ou d'acétone	cm ³ 1/10 ^e pur	cm ³ 1/10 ^e au 1/2	cm ³ 1/10 ^e au 1/3	cm ³ 1/10 ^e au 1/4	0
Solution d'hématies	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³
Eau salée	1 cm ³ 9/10 ^e	1 cm ³ 9/10 ^e	1 cm ³ 9/10 ^e	1 cm ³ 9/10 ^e	2 cm ³

Au bout d'une 1/2 heure aucune hémolyse ne s'était produite. L'acétone et l'éther, après évaporation, ne peuvent donc provoquer l'hémolyse spontanée.

Cet essai devait d'ailleurs se trouver confirmé par la suite par la précipitation acétonique des protéines. Celle-ci est effectuée suivant la méthode de Piettre. Posant en principe que le contact avec l'acétone combiné avec la chaleur devait favoriser l'altération du pouvoir hémolytique, ce qui sera confirmé plus tard, on opère à la plus basse température possible et dans le minimum de temps.

Dans un tube à centrifuger, placé dans la glace pilée, on porte un volume déterminé de sérum auquel on ajoute deux volumes et demi d'acétone préalablement refroidi de la même manière. Un précipité volumineux et dense se produit. Le tout est agité puis rapidement centrifugé. Le précipité tombant presque aussitôt, une ou deux minutes de centrifugation suffisent. Le liquide est alors séparé du précipité par décantation. On ajoute une nouvelle quantité

d'acétone toujours refroidie, en volume double (à peu près) de celui du sérum initial.

Le tube est de nouveau agité vigoureusement jusqu'à ce que le précipité, aggloméré par la centrifugation, se soit parfaitement remis en suspension au sein de l'acétone. Entre les centrifugations, le tube est replacé dans la glace.

Pendant cette première partie de l'opération l'eau du sérum se trouve totalement éliminée, si du moins on a eu soin de ne pas laisser de grumeaux de précipité après chaque addition d'acétone, l'eau entraîne les matières minérales, et la plupart des matières grasses sont entraînées par l'acétone à chaque décantation.

Quant à la lécithine elle reste adsorbée sur le précipité acétonique.

Pour éliminer les restes d'acétone et de cholestérol on effectue deux lavages à l'éther de la même manière que les précédents.

Après la dernière centrifugation, l'éther est éliminé par décantation et le magma du précipité est versé dans une capsule de verre et porté dans un dessiccateur à vide phosphorique ou sulfurique. Le produit se trouve rapidement sec.

La moindre trace d'eau, qu'elle ait été laissée par lavage acétonique insuffisant, ou qu'elle ait été ajoutée par inadvertance (ce qui est possible, l'opération se poursuivant au sein de la glace fondante) donne un aspect jaune et granuleux ou quelquefois corné au produit qui ne se dessécherait que beaucoup plus lentement. Bien menées, précipitation et dessiccation peuvent ne durer qu'une demi-heure environ.

Le produit ainsi obtenu (après avoir été légèrement trituré au mortier), est une poudre très fine et très légère d'un blanc parfait.

Il se dissout complètement dans l'eau salée à 8 p. 1.000, en volume égal à celui du sérum initial. La solution est de couleur pâle, limpide, quelquefois cependant légèrement louche. Elle présente les caractères généraux des solutions de protéines coagulées par la chaleur, par certains minéraux (sulfate d'ammoniaque, sulfate de magnésie), donne les

réactions xanthoprotéiques, du biuret, de Millon. Enfin, la dialyse précipite en partie cette solution.

Le poids du précipité acétonique se montre à peu près constant à 1,5 % près, environ.

0 gr., 70 pour 10 cm³;

0 gr., 58 pour 10 cm³;

0 gr., 69 pour 10 cm³;

0 gr., 65 pour 10 cm³;

0 gr., 55 pour 10 cm³;

ce qui fait une proportion moyenne de 6 à 7 p. 100.

Il ne s'agit là, d'ailleurs, que d'une approximation, la technique de précipitation, telle qu'elle a été menée, n'ayant pas les caractères d'un dosage.

On peut donc dire que la méthode à l'acétone précipite à peu près quantitativement les matières protéiques du sérum sur lesquelles se trouve adsorbée la lécithine.

Les premières expériences ont été faites sur un sérum de cheval normal. Nous avons fait un essai hémolytique de la solution de protéines totales obtenue. Cet essai ayant été négatif nous avons eu confirmation de la pureté des réactifs.

En résumé la méthode à l'acétone permet d'obtenir les protéines du sérum dans un état de pureté très satisfaisant.

2. — *Pouvoir hémolytique des protéines totales obtenues par la méthode à l'acétone.*

A partir d'un sérum hémolytique traité pareillement, que devient le pouvoir hémolytique ? Il s'agit alors de comparer une hémolyse obtenue par un immunsérum avec celle causée par ses protéines totales. Pour comparer deux pouvoirs hémolytiques on peut suivre les règles suivantes :

1° La solution des matières protéiques ou des substances dont on veut comparer le pouvoir hémolytique à celui d'un sérum ou d'une autre solution initiale correspond en volume à ce sérum ou à cette solution.

2° Les essais sont conduits simultanément sur les produits des deux termes de la comparaison.

3° Au bout d'un temps déterminé (une heure) le titre hémolytique de chaque substance est fixé par la dilution ultime où l'hémolyse a eu lieu ou en valeur absolue par le volume en L de solution hémolytique contenue dans cette dilution.

4° La perte de pouvoir hémolytique, s'il y a lieu, est appréciée par la différence entre le titre hémolytique des deux substances ou entre les quantités (en valeur absolue) de solution hémolytique mise en œuvre et ramenée à 100.

5° Un tube-témoin ne contenant pas de complément ne doit pas être hémolysé à la fin de l'expérience (tableau III).

Tableau III.

*Pouvoir hémolytique des matières protéiques
d'un sérum comparé au pouvoir hémolytique de ce sérum.*

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Vol. de solut. hémolytique	100 L	50 L	33 L	20 L	14 L	10 L	5 L	100 L
Titre	10	20	30	50	70	100	200	10
<i>Après 1/2 heure. Sérum</i>	H	H	H	O	O	O	O	O
Sol. de protéines (1)	H	h	O	O	O	O	O	O
<i>Après 1 heure. Sérum</i>	H	H	H	H	H	h	O	O
Sol. de protéines	H	H	h	O	O	O	O	O
<i>Après 1 h. 1/2. Sérum</i>	H	H	H	H	H	H	O	O
Sol. de protéines	H	H	H	O	O	O	O	O

Ce premier essai montre donc nettement une perte de pouvoir hémolytique entre le sérum initial et ses protéiques séparées par la méthode à l'acétone.

(1) En moyenne 7 mg. p. 100 L de solution.

Au bout de 30 minutes il faut en effet :

100 μ de solution de protéines pour hémolyser 1 cm³ de suspension d'hématies.

33 μ de sérum pour hémolyser 1 cm³ d'hématies.

La perte est donc de 67 p. 100 (100-33)

Au bout d'une heure :

Il faut 50 μ de solution de protéines pour hémolyser 1 cm³ de suspension d'hématies.

Il faut 14 μ de sérum pour hémolyser 1 cm³ de suspension d'hématies.

La perte est donc de 71 p. 100.

Le titre du sérum est donc 70 et celui des matières protéiques 20.

Au bout d'une heure et demie :

Il faut 33 μ de solution de protéines pour hémolyser 1 cm³ de suspension d'hématies.

Il faut 10 μ de sérum pour hémolyser 1 cm³ de suspension d'hématies.

La perte est donc de 69 μ

Il faut remarquer que la précipitation de ce premier essai a été accomplie lentement en un temps d'ailleurs non mesuré exactement.

Action du mode de précipitation acétonique sur le pouvoir hémolytique.

Il peut sembler à priori, qu'une telle perte de pouvoir hémolytique était due à l'acétone, c'est ce que tend à prouver l'expérience suivante :

Un certain volume de sérum hémolytique est traité par la méthode à l'acétone à basse température et dans le minimum de temps. L'opération menée à 0°, a duré 15 minutes. Les protéines sont dissoutes dans l'eau salée à 8 p. 1.000 (solution I).

Un volume égal du même sérum est, lui aussi, précipité

par le même réactif; mais on prolonge d'une heure le contact avec l'acétone et l'on opère à la température du laboratoire. Les matières protéiques ayant le même aspect que les précédentes sont reprises par l'eau salée à 8 p. 1.000 (solution II).

On compare alors entre eux les pouvoirs hémolytiques de deux solutions et du sérum initial.

L'expérience en elle-même et comparée avec l'expérience précédente montre l'influence du temps de contact avec l'acétone dans la perte du pouvoir hémolytique.

Au bout d'une heure :

Il faut 100 % de solution II de protéines restées en contact avec l'acétone pour hémolyser 1 cm³ de suspension d'hématies.

Il faut 66 % de solution I de protéines rapidement précipitées.

Il faut 50 % de sérum pour provoquer la même hémolyse.

La perte est donc de 25 à 39 % avec une précipitation très rapide et de 50 % environ avec une précipitation plus lente.

La réaction du milieu influe, elle aussi, sur le pouvoir hémolytique des protéines obtenues.

Au cours de ce travail nous avons souvent fait intervenir les réactions des milieux. D'une façon générale, nous avons donc apprécié la concentration en ions H de nos liqueurs en mesurant le pH. Les mesures colorimétriques faites à la touche nous ont donné satisfaction: la teinte obtenue était comparée à une teinte équivalente indiquée par l'échelle de Clark (26). Lorsqu'il nous a fallu ajuster à un pH déterminé nous avons généralement employé, pour modifier la réaction tantôt l'acide acétique N/10 tantôt la soude N/10 suivant le cas: Si donc, on change la réaction en précipitant le sérum hémolytique successivement aux pH 2,5; 4,7; 6,9 on constate qu'un essai hémolytique tenté après élimination par dialyse de l'excès d'acide ou d'alcali, est complètement négatif. D'autre part EHRlich et SACKS (27) puis

MICHAELIS et SKWIRSKY (28) ont montré l'action inhibitrice des alcalins sur l'alexine dans les réactions hémolytiques.

Il convient enfin de déterminer l'influence de la température au cours de la précipitation.

Deux volumes égaux du même sérum hémolytique sont traités par l'acétone et l'éther, l'un est précipité à 0° (glace fondante) et l'autre à —15° (glace et sel marin à parties égales).

Dans ce dernier cas on a soin de placer d'abord l'acétone au sein du mélange réfrigérant; le sérum qui se prendrait en masse à une telle température est ajouté à l'acétone à —15° après avoir été porté quelques instants à 0°. Le reste de l'opération se poursuit normalement. Après dessiccation les matières précipitées à 0° sont dissoutes dans l'eau salée à 8 p. 1.000 (solution I), il en est de même avec les substances précipitées à —15° (solution II).

L'hémolyse est menée comparativement entre ces deux solutions (tableau IV).

Tableau IV.

TUBES		1	2	3	4	5	6	Témoin
Valeur absolue		100 $\angle$	75 $\angle$	66 $\angle$	50 $\angle$	33 $\angle$	25 $\angle$	100 $\angle$
Titre		10	13	15	20	30	40	10
En 15 minutes :								
Solution	I	h	O	O	O	O	O	O
Solution	II	h	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :								
Solution	I	h	h	O	O	O	O	O
Solution	II	h	h	O	O	O	O	O
En 45 minutes :								
Solution	I	h	h	h	O	O	O	O
Solution	II	H	h	h	h	O	O	O
En 1 heure :								
Solution	I	H	H	h	h	O	O	O
Solution	II	H	H	H	h	h	O	O

Diverses expériences menées suivant la technique précitée permettent de préciser la perte de pouvoir hémolytique au cours de la précipitation acétonique effectuée à 0° en vingt minutes (tableau V).

Tableau V.

TUBES		1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Valeur absolue		100 $\%$	75 $\%$	66 $\%$	50 $\%$	33 $\%$	25 $\%$	20 $\%$	100 $\%$
Titre		10	13	15	20	30	40	50	10
En 15 minutes :									
Sérum	I	H	H	H	h	h	O	O	O
Protéines	I	H	H	h	h	O	O	O	O
Sérum	II	H	H	H	H	h	h	O	O
Protéines	II	H	H	h	h	O	O	O	O
Sérum	III	H	H	h	h	h	O	O	O
Protéines	III	h	h	h	O	O	O	O	O
En 30 minutes :									
Sérum	I	H	H	H	H	H	h	O	O
Protéines	I	H	H	H	H	h	h	O	O
Sérum	II	H	H	H	H	h	h	O	O
Protéines	II	H	H	H	h	h	O	O	O
Sérum	III	H	H	H	H	h	h	O	O
Protéines	III	H	H	h	h	O	O	O	O
En 45 minutes :									
Sérum	I	H	H	H	H	H	H	h	O
Protéines	I	H	H	H	H	h	h	h	O
Sérum	II	H	H	H	H	H	H	h	O
Protéines	II	H	H	H	H	h	O	O	O
Sérum	III	H	H	H	H	H	h	h	O
Protéines	III	H	H	H	h	h	h	h	O
En 1 heure :									
Sérum	I	H	H	H	H	H	H	H	O
Protéines	I	H	H	H	H	h	h	h	O
Sérum	II	H	H	H	H	H	H	H	O
Protéines	II	H	H	H	H	H	h	h	O
Sérum	III	H	H	H	H	H	H	H	O
Protéines	III	H	H	H	H	h	h	h	O

La diminution d'activité hémolytique est donc de 30 p. 100

Devant cette perte on peut se demander si les résultats obtenus par M. Piettre (29) qui opère à partir de sérum de cheval antimouton, ne tenaient pas à la nature du sérum. M. Piettre ayant eu l'obligeance de nous donner quelques centimètres cubes de sérum de cheval antimouton nous avons préparé à l'aide de ce sérum de sa solution de protéines et de globules de mouton au 1/20 des dilutions correspondant aux titres 100. 110. 120. 130. 140. 150. On pouvait ainsi suivre l'hémolyse et en percevoir le terme au bout d'une heure (tableau V bis).

Tableau V bis.

TUBES	1	2	3	4	5	6	Témoin
Titre	100	110	120	130	140	150	100
En 15 minutes :							
Sérum	h	h	h	h	h	h	O
Protéines	h	h	O	O	O	O	O
En 30 minutes :							
Sérum	h	h	h	h	h	h	O
Protéines	h	h	h	O	O	O	O
En 45 minutes :							
Sérum	H	H	H	h	h	h	O
Protéines	h	h	h	h	h	O	O
En 30 minutes :							
Sérum	H	H	H	H	H	H	O
Protéines	H	h	h	h	h	h	O

Dans ce cas encore la perte peut être évaluée aux environs de 30 p. 100.

Nous pensons que cette perte est constante. D'ailleurs M. Piettre parle de valeurs *sensiblement* égales (30) et d'autre part les conditions de titrage que nous avons employées font d'autant plus facilement apparaître les pertes que les échelons de dilutions sont plus rapprochés.

De l'ensemble de ces expériences, il ressort donc que la méthode à l'acétone ne saurait conserver leur pouvoir hémolytique intégral aux matières protéiques qu'elle précipite. La perte d'hémolysine qui résulte du traitement peut d'ailleurs être atténuée en un temps le plus court possible et en opérant à la plus basse température possible.

3. — Séparation de la globuline et de la sérine.

Etude de leur activité hémolytique.

Le traitement acétonique d'un sérum met en présence d'un ensemble de matières protéiques dont diverses réactions chimiques peuvent scinder les constituants. Ainsi l'acidification est capable de précipiter une substance que l'on peut considérer parfaitement définie si, d'une part, cette substance ne se sépare de la solution de protéine qu'à un taux d'acidification bien déterminé et si, d'autre part elle présente certaines réactions constantes qui n'appartiennent qu'à elle.

On fixe donc d'abord les conditions nécessaires à cette première séparation; elles sont au nombre de trois: absence d'électrolyte dans la solution, acidification à un pH déterminé, dilution convenable.

1° La présence d'électrolytes entrave la précipitation à l'acide.

2° La floculation optima a lieu pour une dilution égale à 2 ou 2,5, à partir du volume du sérum ou de la solution équivalente mise en œuvre.

3° *Acidification*: La globuline précipite à son point isoélectrique: p H 5,4. MM. Piettre et Chrétien (31) déterminaient dans les tubes à hémolyse, sur les prises d'essai variant de 0 cm³ 5 et 1 cm³ la quantité d'acide SO⁴H² ou HCl N/100 capable de provoquer la précipitation optima sous forme de flocons se déposant rapidement, puis ils calculaient le volume d'acide N/1 ou N/10 à ajouter à l'ensemble du liquide à précipiter.

Reprenant d'abord à peu près cette méthode on prépare

les mélanges suivants, d'après les dilutions indiquées sur le tableau :

Tubes		1	2	3	4	5	6	7	8
HCl	N	cm ³ 0,45	cm ³ 0,50	cm ³ 0,55	cm ³ 0,60	cm ³ 0,65	cm ³ 0,70	cm ³ 0,75	cm ³ 0,80
	100								
H ² O distillée		cm ³ 0,55	cm ³ 0,50	cm ³ 0,45	cm ³ 0,40	cm ³ 0,35	cm ³ 0,30	cm ³ 0,25	cm ³ 0,20
Solution de protéines		cm ³ 0,25	cm ³ 0,25	cm ³ 0,25	cm ³ 0,25	cm ³ 0,25	cm ³ 0,25	cm ³ 0,25	cm ³ 0,25

Il se produit un louche dans tous les tubes, sauf dans le tube 8. Ce louche croît en intensité du tube 1 au tube 3 et décroît du tube 5 au tube 7. Par centrifugation à vitesse moyenne des tubes 3, 4 et 5, c'est le tube 4 qui se clarifie le premier. Le liquide surnageant est au p H 5,4 (p H colorimétrique); le taux d'acidification qui entraîne la précipitation optima du précipité, se trouve ainsi déterminé.

A l'appui de ces considérations, d'une façon générale, on précipite la globuline de la façon suivante : étant donné un poids déterminé de protéines sériques, on les dissout dans un volume d'eau distillée égal à celui du sérum initial. Après avoir dilué au 1/2 cette solution avec de l'eau distillée saturée d'éther, on amène au pH 5,4 indiqué au rouge de phénol sur prise d'essai. Il se produit alors un précipité qu'on laisse déposer puis que l'on sépare par centrifugation.

Le poids de ce précipité après dessiccation à l'étuve représente à peu près 1/4 du poids des protéines totales. Il est insoluble dans l'eau distillée et ne se dissout que par légère alcalinisation. Il précipite par le sulfate de magnésie. Ces caractères prouvent que nous sommes en présence de la sérum-globuline.

Les essais hémolytiques faits avec la sérum-globuline en solution salée à 8 p. 1.000 se montrent toujours négatifs confirmant, en cela, les travaux antérieurs.

Etude chimique et hémolytique de la solution de protéines débarrassée de la globuline.

Après avoir été séparée de la globuline comme il vient d'être dit, la solution des protéines du sérum présente les caractères suivants : elle ne précipite pas par addition d'HCl N/10 ajouté goutte à goutte jusqu'à réaction acide, elle ne précipite pas par addition de sulfate de magnésie, ni par le chlorure de sodium à saturation en milieu neutre. Cette solution possède les caractères d'une solution de sérine.

Le pouvoir hémolytique peut en être étudié, mais alors deux précautions sont à prendre. La solution qui garde l'acidité voulue par la précipitation de la globuline doit être neutralisée. Ayant choisi le bleu de bromothymol comme indicateur, nous ajoutons de la soude N/10 jusqu'à ce que la teinte d'une prise d'essai indique le pH 7 environ (teinte bleue verdâtre). En outre, au cours de ces traitements divers (précipitation de la globuline, neutralisation), la solution de sérine, qui, au début, a été ajustée à la concentration du sérum a été sensiblement diluée du simple au double au moins. Si l'on veut comparer le pouvoir hémolytique de cette solution à celui du sérum et des protéines totales, il devient nécessaire de tenir compte de la dilution en doublant au moins la dose de sensibilisatrice dans le mélange hémolytique.

Dans cet essai le témoin contenant globules et sensibilisatrice, sans alexine, prend un rôle particulièrement important : la solution de sérine, en effet, n'est pas isotonique, et il est intéressant de s'assurer qu'il ne se produit pas une hémolyse qui de ce fait ne dépendrait nullement des facteurs biologiques.

Un premier essai, mené isolément sur cette solution de sérine montre qu'elle possède un pouvoir hémolytique. Nous pouvons alors comparer ce pouvoir hémolytique à celui du sérum initial et à celui de la solution de protéines totales ; nous avons le tableau suivant : (tableau VI).

Tableau VI.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	Témoin pur
Valeur absolue	100 $\angle$	75 $\angle$	66 $\angle$	50 $\angle$	33 $\angle$	25 $\angle$	20 $\angle$	100
Titre	10	13	15	20	30	40	50	10
En 15 minutes :								
Sérum	H	H	H	H	h	h	O	O
Sol. de protéines	H	H	h	h	O	O	O	O
Sol. de sérine	H	H	h	h	O	O	O	O
En 30 minutes :								
Sérum	H	H	H	H	H	h	h	O
Sol. de protéines	H	H	H	h	h	O	O	O
Sol. de sérine	H	H	H	h	h	O	O	O
En 45 minutes :								
Sérum	H	H	H	H	H	H	h	O
Sol. de protéines	H	H	H	H	O	O	O	O
Sol. de sérine	H	H	H	H	O	O	O	O
En 1 heure :								
Sérum	H	H	H	H	H	H	H	O
Sol. de protéines	H	H	H	H	H	H	h	O
Sol. de sérine	H	H	H	H	H	H	h	O

Les expériences qui montrent que l'hémolysine accompagnée la sérum albumine se trouvent confirmées.

Le traitement qui élimine la globuline de la solution des protéines totales paraît sans action sur le pouvoir hémolytique, l'acétone seule l'ayant altérée.

4. — *Essais tentés pour obtenir une sérine sèche hémolytique à partir de la méthode à l'acétone.*

a) *Précipitation de la sérine par l'acétone.*

Ayant obtenu une solution de sérine, déjà sensiblement purifiée et possédant encore un pouvoir hémolytique appréciable, peut-on préparer une sérine sèche douée de la même

propriété ? Un tel produit serait intéressant à plusieurs titres. Sa conservation serait assurée à l'état de poudre sèche : non stérilisée la solution de sérine est sujette à toutes les fermentations et son pouvoir hémolytique dépend de la température à laquelle elle est conservée. Il serait facile de déterminer la quantité minima d'eau nécessaire pour dissoudre cette poudre hémolytique et le rapport entre l'activité et le volume d'une telle solution justifierait peut-être au point de vue pratique ces opérations de purification.

Enfin cette purification s'arrêterait-elle là et n'envisagerait-on pas la possibilité de faire un pas de plus vers une nouvelle désintégration ?

On peut essayer de précipiter la sérine de sa solution. Il était possible pour cela de faire appel à la méthode à l'acétone de Piettre telle qu'elle a été pratiquée pour séparer les protéines totales du sérum. Elle n'a donné, il est vrai, qu'un résultat approché, mais seul importe le rapport entre l'activité du produit et son volume : d'ailleurs cette technique doit nous conduire à une nouvelle purification du produit.

A partir donc d'un sérum hémolytique, on précipite les protéines totales à 0°, le plus rapidement possible, en employant pour cela l'acétone et l'éther dans les mêmes proportions que précédemment. Les protéines desséchées sont dissoutes dans de l'eau distillée et la solution amenée au p H 5,6. Le précipité de globuline est séparé par centrifugation ; on recueille le liquide surnageant et l'on en note le volume.

Cette solution de sérine est alors traitée à 0° par 2 volumes et demi d'acétone, le précipité est lavé deux fois par deux volumes d'acétone, deux volumes d'éther et séché.

On obtient une poudre blanche très légère et très fine, en tout semblable, au point de vue macroscopique, à la poudre de protéines totales obtenue plus haut.

Ce produit est complément soluble dans l'eau salée et l'eau distillée, ne précipite pas par acidification ou alcali-

nisation, ni par le sulfate de magnésie et le chlorure de sodium en milieu neutre. Ce sont là les caractères de la sérine.

Cette sérine pulvérulente est reprise par l'eau salée à 8 p. 1.000 en volume égal à celui du sérum initial. On peut chercher le pouvoir hémolytique en conduisant notre essai comparativement sur le sérum, les protéines totales, et la solution de sérine. L'expérience pour être plus concluante se poursuit une vingtaine d'heures (tableau VII).

Tableau VII.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Témoin
Valeur absolue	100 /	50 /	33 /	25 /	20 /	16 /	14 /	12 /	11 /	10 /	100 /
Titre	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	10
En 15 minutes :											
Sérum	h	h	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Sol. de protéines	h	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Sol. de sérine	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :											
Sérum	H	h	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Sol. de protéines	h	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Sol. de sérine	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 55 minutes :											
Sérum	H	H	h	h	h	O	O	O	O	O	O
Sol. de protéines	H	h	h	O	O	O	O	O	O	O	O
Sol. de sérine	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 20 heures :											
Sérum	H	H	H	H	H	H	h	h	h	O	O
Sol. de protéines	H	H	H	H	h	h	h	O	O	O	O
Sol. de sérine	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Au cours d'un second traitement à l'acétone, la sérine déjà purifiée semble donc avoir complètement perdu son pouvoir hémolytique.

Cette expérience peut être répétée de façons diverses :

On cherche d'abord à augmenter la quantité de sensibilisatrice dans le mélange hémolytique. En effet, si l'on admet que l'activité de l'alexine diminue rapidement avec le temps, et si, d'autre part l'hémolyse existe encore dans la sérine mais en quantité trop faible pour agir dans le temps d'activité de l'alexine, elle a très facilement pu nous échapper dans l'expérience précédente. A notre échelle habituelle on ajoute donc deux tubes, l'un recevant 2/10 cm³ de solution de sérine non diluée et l'autre 1,5/20 cm³ du même liquide : le volume total du mélange hémolytique final est toujours de 3 cm³, l'eau salée à 8 p. 1.000 étant ajoutée en conséquence.

L'essai a lieu comparativement sur la solution de sérine avant la seconde précipitation acétonique et sur la sérine précipitée à l'acétone, puis redissoute dans l'eau salée (tableau VIII).

Tableau VIII.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	Témoin
Valeur absolue	200 $\angle$	150 $\angle$	100 $\angle$	75 $\angle$	66 $\angle$	50 $\angle$	33 $\angle$	25 $\angle$	200 $\angle$
Titre	5	7,5	10	13	15	20	30	40	5
En 15 minutes :									
Sérine non pr.	h	h	O	O	O	O	O	O	O
Sérine préc.	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :									
Sérine non pr.	H	h	h	O	O	O	O	O	O
Sérine préc.	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 45 minutes :									
Sérine non pr.	H	H	h	h	O	O	O	O	O
Sérine préc.	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 1 heure :									
Sérine non pr.	H	H	O	h	h	h	O	O	O
Sérine préc.	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 16 heures :									
Sérine non pr.	H	H	H	h	h	h	O	O	O
Sérine préc.	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Donc dans de telles conditions expérimentales, la sérine précipitée à l'acétone semble bien n'être hémolytique à aucun taux.

Il convient toutefois de remarquer que la précipitation acétonique de la sérine, telle que nous l'avons décrite a lieu à partir d'une liqueur légèrement acide, précédemment ajustée au pH 5,6 en vue de précipiter la globuline. Or, si nous revenons à certaines expériences mentionnées plus haut on constate qu'une précipitation acétonique menée en réaction même légèrement acide entravait l'activité des protéines totales obtenues à partir d'un sérum hémolytique. On peut penser qu'il en est de même pour une sérine précipitée au p H 5,6.

Après avoir, donc, éliminé la globuline de la solution de protéines totales hémolytiques, comme il a été dit, on neutralise au p H 7 la solution de sérine à l'aide de soude N/10 en prenant le bleu de bromothymol comme indicateur. La précipitation de la sérine a lieu ensuite.

L'essai hémolytique habituel fait sur cette sérine à partir d'une concentration de 200 μ et mené comparativement avec le sérum initial et les protéines totales se montre encore négatif.

Etant donné enfin que les protéines hémolytiques étaient plus actives précipitées à -15° qu'à 0° on peut chercher si, en précipitant nos produits à cette température de -15° on obtient une sérine hémolytique. L'opération est menée comme d'habitude : préparation des protéines totales, élimination de la globuline ; obtention de la sérine sèche ; les précipitations acétoniques sont faites au sein d'un mélange à parties égales de sel et de glace.

L'essai hémolytique est effectué comparativement sur le sérum initial, sur les protéines totales et sur la sérine on obtient le tableau suivant (tableau IX).

Tableau IX.

TUBES	1	2	3	4	5	6	Témoin
Valeur absolue	100 $\%$	75 $\%$	56 $\%$	50 $\%$	33 $\%$	25 $\%$	100 $\%$
Titre	10	13	15	20	30	40	10
En 15 minutes :							
Sérum	H	H	h	h	h	h	O
Protéines	h	O	O	O	O	O	O
Sérine	O	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :							
Sérum	H	H	H	h	h	h	O
Protéines	h	h	O	O	O	O	O
Sérine	O	O	O	O	O	O	O
En 45 minutes :							
Sérum	H	H	H	H	h	h	O
Protéines	H	h	h	h	h	O	O
Sérine	O	O	O	O	O	O	O
En 1 heure :							
Sérum	H	H	H	H	H	h	O
Protéines	H	H	h	h	h	h	O
Sérine	O	O	O	O	O	O	O

On peut donc conclure que dans la technique expérimentale suivie, il est toujours impossible de retrouver une activité hémolytique sur une sérine pure.

Quelques réserves s'imposent cependant.

De ces expériences faites sur la sérine et régulièrement négatives, on ne saurait conclure à la disparition totale et absolue de l'hémolysine. La concentration de sensibilisatrice adoptée (200 $\%$ pour 1 cm^3 d'hématies) est à la limite de l'intérêt pratique. Il ne faudrait toutefois pas en déduire qu'en augmentant la dose on ne pourrait finir par retrouver une activité quelconque.

En mentionnant cette perte de pouvoir hémolytique insistons sur les conditions expérimentales : l'acétone en parti-

culier, déshydratant énergétique, rompant violemment les équilibres micellaires, et éliminant la lécithine, semble, à priori, avoir une grande part dans la diminution de l'activité hémolytique des produits qui lui étaient soumis (32).

Au moment même où nous menions ces recherches, un biochimiste tchéco-slovaque, M. Bergauer (33), étudiait la stabilisation des albumines par les globulines. Son travail paru en février 1928, pouvait fournir une explication à nos conclusions. Depuis quelques années, il avait été remarqué que les protéines totales du sérum étaient relativement plus stables que leurs diverses fractions isolées contre certains changements d'état comme la coagulation par la chaleur et l'alcool. Les expériences de Bergauer montrèrent que, pour une même quantité d'albumine le trouble produit par l'alcool est plus faible, si on ajoute une certaine quantité de globuline. Si cette globuline a été, au préalable, débarrassée des lipoïdes qui lui sont adsorbées à l'état naturel, le trouble produit dans les mêmes conditions est presque aussi considérable que si on n'avait pas ajouté de globuline. Il ressortait donc, que si les globulines ont un rôle protecteur vis-à-vis de l'albumine, ce rôle ne leur appartient pas en propre. En définitive ce sont les lipoïdes (lécithines principalement) qui stabilisent l'albumine contre certaines coagulations.

Pouvait-on étendre ces conclusions au problème qui nous occupe ? A priori, cela ne paraissait pas impossible. En effet il n'y a pas de rapport entre la perte du pouvoir hémolytique des protéines totales traitées par l'acétone et celle de la sérine ayant subi le même traitement.

Au point de vue donc du pouvoir hémolytique, comme au point de vue de leur coagulation par l'alcool, les protéines totales se montrent beaucoup plus stables que la sérine qui en dérive.

Au cours d'un premier traitement à l'acétone, en effet, la sérine hémolytique est au contact de ses éléments stabilisateurs, la perte de pouvoir hémolytique est alors relativement faible. Puis les lipoïdes sont entraînés à l'éther, la globuline,

séparée par l'acide, enlève les dernières traces de lécithines qui auraient pu être adsorbées. Il est facile de concevoir qu'un second contact avec l'acétone peut être infiniment plus préjudiciable que le premier à l'activité hémolytique d'une sérine ainsi purifiée et non stabilisée cette fois.

b) Evaporation de la solution de sérine.

La méthode à l'acétone ne nous ayant pas permis d'obtenir une sérine précipitée, pure et douée de propriétés hémolytiques, nous avons utilisé un procédé dont la simplicité permettait de traiter moins brutalement la solution de sérine : l'évaporation au vide. Ainsi saurions-nous s'il était impossible à priori, d'obtenir une sérine pure et hémolytique.

La première partie de l'expérience est menée de la façon habituelle. Les protéines totales précipitées à l'acétone et lavées à l'éther sont débarrassées de la globuline par l'acidification au p H 5,6 et on est en possession d'une solution de sérine légèrement acide et hémolytique. Il ne paraît pas nécessaire de neutraliser la solution : l'acide chlorhydrique employé étant volatil s'élimine à l'évaporation.

La solution de sérine est alors mise à évaporer au vide profond. Quelques précautions sont à prendre afin qu'une ébullition trop rapide ne fasse déborder le récipient contenant la sérine. L'opération ayant intérêt à s'accomplir en un temps minimum on la commence dans un ballon en verre épais porté à 30° au moyen d'eau tiède. La majeure partie de l'eau s'élimine ainsi. L'évaporation se poursuit alors sous vide phosphorique en 20 heures à peu près. Au bout de ce temps on obtient une sérine sèche se présentant en paillettes transparentes et jaunâtres se détachant facilement de la capsule. Ce n'est plus là le produit anhydre que nous donnait l'acétone ; entre les lamelles cristallines est retenue l'eau d'interposition. A-t-on au moins l'avantage d'être en présence d'un produit hémolytique ?

Cette sérine pulvérisée est reprise par l'eau salée à 8 p. 1.000 en volume égal à celui du sérum initial et on en mesure le pouvoir hémolytique (tableau X).

Tableau X.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
quantité de solution de sérine desséchée en valeur absolue.	200 μ	150 μ	100 μ	75 μ	75 μ	50 μ	33 μ	200 μ
Titre	5	7,5	10	13	15	20	30	5
En 15 minutes.	O	O	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes.	h	h	h	O	O	O	O	O
En 45 minutes :	H	H	h	O	O	O	O	O
En 1 heure :	H	H	h	h	O	O	O	O
En 2 heures :	H	H	H	H	h	h	h	O
En 4 heures :	H	H	H	H	H	H	h	O
En 6 heures :	H	H	H	H	H	H	H	O

Nous voyons donc que dans ces conditions on peut obtenir une sérine solide hémolytique. L'hémolyse est plus lente, il est vrai, que celles que l'on a été habitué à constater jusqu'à présent; elle est cependant assez complète puisque en un temps convenable elle se poursuit aux faibles dilutions. Le produit obtenu est donc intéressant par lui-même, quoique sa préparation, nécessitant le vide profond à quelques millimètres de mercure soit peu pratique. Mais surtout ce résultat démontre qu'il est possible d'obtenir une sérine hémolytique pure, desséchée et de ce fait susceptible de conserver son activité. Il suffit pour cela d'employer des réactifs de précipitation appropriés, n'agissant pas par déshydratation violente.

CHAPITRE TROISIÈME

Essai de concentration de l'activité hémolytique par précipitation, au moyen de quelques électrolytes au point isoélectrique

1. — PRECIPITATION D'UNE SERINE HEMOLYTIQUE PAR LE CHLORURE DE SODIUM

1. — *Technique de la précipitation.*

Parmi ces réactifs à action modérée se trouvent les sels. Depuis longtemps ils constituent une méthode qu'avaient préconisée les Allemands. Cependant les précipités qu'ils séparent d'un sérum ne sont que des mélanges complexes, ce qui a fait abandonner successivement les différents procédés de précipitation qui en découlaient. Toutefois, cet inconvénient n'existerait plus si la précipitation saline s'opérait sur une solution déjà purifiée de sérine.

Deux conditions sont nécessaires pour précipiter la sérine de sa solution :

1° L'acidité de la liqueur doit être au pH 4,7 point isoélectrique de la sérine.

2° La solution doit être enrichie en électrolytes.

L'expérience justifie cette double condition.

L'addition de chlorure de sodium, même jusqu'à saturation de la liqueur, ne provoque aucune floculation en milieu neutre. Il en est de même pour toute autre acidité que le

pH 4,7 (pH 5,4 et pH 2, par exemple), mais sitôt que l'on atteint ce point, le sel provoque un volumineux précipité.

De même la sérine en solution d'eau distillée ne floccule pas par acidification, à quelque taux que l'on se trouve. Mais en présence de chlorure de sodium à 5 p. 100 un précipité appréciable se manifeste. Ce précipité se fait plus abondant à mesure que l'on augmente la proportion de chlorure de sodium.

Il est intéressant de déterminer quelle proportion de chlorure de sodium est nécessaire pour précipiter entièrement la sérine de sa solution.

Dans ce but on prépare à partir d'une sérine pure et sèche, préalablement préparée par la méthode à l'acétone, une solution à 6 p. 100 ajustée au pH 4,7.

Dans une série de tubes on effectue les mélanges suivants des quantités croissantes de chlorure de sodium.

TUBES	1	2	3	4	5	6
Solution de sérine à 6 %	2 cm ³	2 cm ³	2 cm ³	2 cm ³	2 cm ³	2 cm ³
Eau distillée	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³
Chlorure de sodium	0 gr. 15	0 gr. 30	0 gr. 45	0 gr. 60	0 gr. 75	0 gr. 90
Taux en NaCl	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %

Le taux de 30 p. 100 étant à peu près la limite de la solubilité de chlorure de sodium dans l'eau, il est impossible d'obtenir une concentration plus forte.

On constate un précipité dans chacun des tubes, faible dans le premier et le second, très abondant dans les autres. Apprécier le poids de ce précipité d'une façon précise est délicat : en effet s'il est facile de le dessécher à peu près complètement dans l'étuve à eau bouillante, on ne saurait en noter le poids sans l'avoir débarrassé au préalable de la quantité de chlorure de sodium qui y reste adsorbé, se dessèche avec lui, et fausse les résultats. Il faut donc

employer un procédé qui, sans prétendre à une précision absolue rigoureuse, permet cependant une approximation suffisante pour entraîner une conclusion pratique.

Les précipités de sérine et de chlorure de sodium formés dans de petits tubes à hémolyse tarés sont séparés par centrifugation et décantation du liquide qui les surnage. Les 6 tubes et leur contenu sont desséchés 24 heures à l'étuve puis pesés. On obtient ainsi le poids total de la sérine et du chlorure de sodium dans les précipités que l'on redissout facilement dans 10 cm³ d'eau distillée, on dose alors le chlorure de sodium. Cette seconde partie de l'opération s'effectue par la méthode de Charpentier et Vohlard après qu'on s'est débarrassé de la matière protéique par le permanganate. Pour cela 5 cm³ des solutions de sérine sont additionnés de :

solution de NO³Ag N/10 10 cm³
 solution saturée de Mn O⁴ K 6 cm³
 NO³ H pur 10 cm³

On porte le tout à l'ébullition pendant quelques minutes : un trouble noir se forme rapidement et lorsque le liquide qui le baigne est devenu limpide on le filtre sur une fiole jaugée. On étend le liquide avec de l'eau distillée qui sert à laver le précipité noir, on ajoute quelques gouttes d'une solution saturée d'alun de fer. On fait ensuite le titrage à l'aide du sulfocyanure de potasse N/10 et l'on calcule la quantité de NaCl.

Voici les résultats obtenus :

TUBES	1	2	3	4	5	6
Taux en NaCl	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %
Poids de sérine + NaCl		0 g. 140	0 g. 174	0 g. 241	0 g. 379	0 g. 390
Poids de NaCl		0 g. 040	0 g. 064	0 g. 055	0 g. 064	0 g. 075
Poids de sérine		0 g. 100	0 g. 110	0 g. 166	0 g. 314	0 g. 315

On peut donc conclure qu'au point isoélectrique de la sérine 4,7, c'est une concentration minima en NaCl de 25 p. 100 qui détermine la précipitation optima de cette sérine.

Les traitements ont été nombreux pour arriver jusqu'à cette sérine solide : précipitation à l'acétone et lavage à l'éther qui ont donné les protéines totales, séparation de la globuline par acidification au pH 5,6 ajustage au pH 4,7 et addition de chlorure de sodium ont été nécessaires pour obtenir un précipité de sérine chargé d'ailleurs de chlorure de sodium à la proportion de 20 p. 100 environ. A travers toutes ces opérations menées à partir d'un immunsérum qu'est devenue l'activité hémolytique ?

On fait une première série d'essais sur le précipité tel que nous l'avons recueilli de sa précipitation, c'est-à-dire renfermant une notable proportion de chlorure de sodium, et dissous dans l'eau distillée en volume égal à celui du sérum initial. Dans ces conditions les essais menés comparativement sur la solution de sérine, sur la solution de protéines totales et sur le sérum initial se montrent tous négatifs pour la sérine alors qu'ils sont normaux dans le cas de sérum et des protéines.

L'hémolysine n'est pas non plus retrouvée dans la partie de la solution de sérine ne précipitant pas par le chlorure de sodium.

Ces résultats d'ailleurs ne sont pas faits pour nous surprendre. Si nous nous souvenons que le chlorure de sodium en solution hypertonique entrave l'hémolyse qui devient complètement négative par une concentration de 15 p. 100 de NaCl, nous aurons là une raison de nous méfier de nos essais faits directement sur le précipité de sérine chargé de NaCl. En effet la sérine précipitée par le chlorure de sodium à 25 p. 100 entraîne, nous l'avons vu, 20 p. 100 de sel. La solution de sérine destinée à l'essai hémolytique contient donc 20 p. 100 de NaCl. Après le mélange avec l'eau salée à 8 p. 1.000 et la suspension d'hématies nous avons une concentration en NaCl bien capable d'entraver l'hémolyse.

2. — *Action de la dialyse sur un produit hémolytique.*

Il convient donc de débarrasser la solution de sérine précipitée par NaCl de son excès de chlorure de sodium. A cette fin on peut mettre à profit la dialyse contre de l'eau distillée à travers une membrane de cellophane. Il est nécessaire de mener rapidement l'opération : on emploie donc une masse importante d'eau distillée pour un petit volume de solution albumineuse, 1 litre environ pour quelques centimètres cubes — pour la même raison, la membrane présente une grande surface : la solution de sérine ne présente à l'intérieur du dialyseur qu'une épaisseur de quelques millimètres.

Cependant Roux (34) et Yersin (35), puis Leullier, Sédalian et Mme Clavel (36) ont montré que la dialyse fait disparaître le pouvoir toxique de la toxine diphtérique totale.

Il est donc nécessaire avant toute expérience de s'assurer qu'une dialyse ainsi effectuée n'est pas susceptible d'agir sur le pouvoir hémolytique de la solution de sérine. On effectue pour cela l'expérience suivante : à partir d'un sérum hémolytique on précipite les protéines totales. Une partie de ces protéines étant mise de côté on dissout l'autre dans l'eau distillée et on sépare la globuline par acidification. La solution de sérine obtenue est mise à dialyser dans les conditions décrites plus haut, la même dialyse est effectuée sur les protéines totales, précipitées par l'acétone et dissoutes dans l'eau salée. Dans des tubes plongeant dans l'eau de dialyse on place comme témoins quelques centimètres cubes de la solution de protéines totales et de la solution de sérine. La double dialyse est maintenue pendant 48 heures. Au bout de ce temps on compare entre eux le pouvoir hémolytique des solutions non dialysées et celui des solutions dialysées. Le résultat des hémolyses tant pour la solution de protéines que pour la solution de sérine indique que la dialyse n'influe en rien sur l'activité d'une solution d'albumine hémolytique et que cette activité ne dialyse pas. Voici à titre d'exemple comment se produit l'hémolyse de

la solution de protéines dialysée et celle de la solution non dialysée (tableau XI).

Tableau XI.

TUBES	1	2	3	4	5	6	Témoin
Valeur absolue	100 $\angle$	75 $\angle$	66 $\angle$	50 $\angle$	33 $\angle$	25 $\angle$	100 $\angle$
Titre	10	13	15	20	30	40	10
En 15 minutes :							
Solution non dialysée	h	O	O	O	O	O	O
Solution dialysée	h	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :							
Solution non dialysée	H	H	h	h	O	O	O
Solution dialysée	H	H	h	h	O	O	O
En 45 minutes :							
Solution non dialysée	H	H	H	h	O	O	O
Solution dialysée	H	H	H	h	O	O	O
En 1 heure							
Solution non dialysée	H	H	H	H	h	h	O
Solution dialysée	H	H	H	H	h	h	O
En 1 heure 15 :							
Solution non dialysée	H	H	H	H	H	h	O
Solution dialysée	H	H	H	H	H	h	O
En 1 heure 30 :							
Solution non dialysée	H	H	H	H	H	h	O
Solution dialysée	H	H	H	H	H	h	O

Assurés de pouvoir sans inconvénient traiter par la dialyse des produits hémolytiques on peut mener l'expérience suivante :

Par les procédés habituels à partir d'un sérum hémolytique on prépare les protéines totales dont on a éliminé la globuline par acidification au pH 5,4. La solution de sérine ainsi obtenue est ajustée au pH 4,7 puis additionnée de chlorure de sodium en quantité nécessaire pour obtenir une concentration en NaCl de 25 p. 100. Un précipité abondant se produit que l'on recueille par centrifugation, que l'on peut sécher et conserver dans cet état. On le dissout dans un volume d'eau distillée égal au volume du sérum initial : La solution se fait sans difficulté et on la dialyse rapidement selon les conditions indiquées plus haut : la dialyse se poursuit pendant 6 heures. Au bout de ce temps, du liquide recueilli dans le dialyseur on fait deux parts :

Dans la première le chlorure de sodium restant en solution est dosé par la méthode rappelée plus haut de Charpentier et Vohlard. On trouve une proportion de 3 gr. 10 de chlorure de sodium par litre, quantité de sel marin qui ne peut évidemment plus gêner notre essai hémolytique.

La seconde partie sert à effectuer l'essai hémolytique de la sérine précipitée par le chlorure de sodium.

Cet essai s'effectue suivant la technique habituelle et donne les résultats suivants (tableau XII).

Tableau XII

TUBES	1	2	3	4	5	Témoin
Valeur absolue	200 μ	150 μ	100 μ	75 μ	60 μ	200 μ
Titre	5	4,5	10	13	15	5
En 15 minutes :						
Sérum	H	h	h	O	O	O
Sérine	o	o	o	o	o	o
En 30 minutes :						
Sérum	H	H	H	h	h	O
Sérine	h	O	O	O	O	O

TUBES	1	2	3	4	5	Témoin
Valeur absolue	200 /	150 /	100 /	75 /	60 /	200 /
Titre	5	4,5	10	13	15	5
En 45 minutes :						
Sérum	H	H	H	H	h	O
Sérine	H	h	O	O	O	O
En 1 heure :						
Sérum	H	H	H	H	H	O
Sérine	H	h	O	O	O	O
En 1 heure 15 :						
Sérum	H	H	H	H	H	O
Sérine	H	H	h	h	h	O
En 15 heures :						
Sérum	H	H	H	H	H	O
Sérine	H	H	H	H	H	O

Il paraît donc possible d'obtenir une sérine pure et sèche douée de propriétés hémolytiques. Toutefois l'activité se montre très sensiblement diminuée, la perte se trouve être de près de 90 p. 100, le sérum employé étant du titre habituel 50 et la sérine du titre 5 : une grande partie de cette perte est due au traitement acétonique, l'autre au traitement ultérieur qui pour nous donner la sérine pure a l'inconvénient d'être très complexe.

3. — *Simplification de la technique.*

Il y a donc peut-être intérêt à simplifier la technique qui, à partir des protéines totales hémolytiques obtenues par l'acétone, donne la sérine. On sait qu'une des principales propriétés de la globuline est d'être insoluble dans l'eau distillée en réaction neutre. Si donc on soumet à la dialyse un mélange de sérine et de globuline dissout dans l'eau salée, le chlorure de sodium s'éliminant à travers la mem-

brane, la globuline précipitera et nous n'aurons plus qu'une solution à peu près pure de sérine. On peut chercher à appliquer ce principe à la préparation et la purification d'une sérine hémolytique.

Les protéines totales sont séparées du sérum par la technique habituelle à l'acétone et à l'éther. Le précipité est repris par de l'eau distillée en volume égal à celui du sérum initial on ajuste au pH 4,7, puis du chlorure de sodium en quantité nécessaire pour en obtenir une concentration de 25 p. 100. On obtient ainsi un précipité volumineux chargé de sel marin que l'on dissout dans de l'eau distillée légèrement alcalinisée. La solution est dialysée contre un grand volume d'eau distillée : la solution qui était limpide au début se trouble peu à peu et bientôt un véritable précipité gélatineux se forme. Au bout d'une vingtaine d'heures le contenu du dialyseur est centrifugé pour séparer le liquide de son précipité.

On recueille le précipité et on le dessèche dans l'étuve à eau bouillante afin de l'identifier. Il est insoluble dans l'eau distillée neutre, soluble en milieu alcalin : cette solution précipite par le sulfate de magnésie. Nous sommes donc bien là en présence des réactions de la sérum-globuline que nous avons ainsi séparée de sa solution.

Quant à la solution limpide après la centrifugation elle présente une réaction très sensiblement neutre (pH 7) et elle ne contient plus qu'une très infime quantité de sel (0 gr. 58 ‰). Cette solution qui coagule par la chaleur, ne précipite plus par le sulfate de magnésie à saturation et ne paraît plus ainsi contenir que de la sérine.

Le pouvoir hémolytique de cette solution de sérine est le suivant : (tableau XIII)

Tableau XIII.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	Témoin
Valeur absolue	200 $\angle$	150 $\angle$	100 $\angle$	75 $\angle$	66 $\angle$	50 $\angle$	33 $\angle$	25 $\angle$	200 $\angle$
Titre	5	4,5	10	13	15	20	30	40	5
En 15 minutes :	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :	h	h	O	O	O	O	O	O	O
En 45 minutes :	h	h	h	h	h	O	O	O	O
En 1 heure :	h	h	h	h	h	O	O	O	O
En 1 heure 15 min.	H	H	h	h	h	O	O	O	O
En 1 heure 30 min.	H	H	h	h	h	O	O	O	O
En 1 heure 45 min.	H	H	H	h	h	O	O	O	O
En 2 heures :	H	H	H	h	h	O	O	O	O
En 20 heures :	H	H	H	H	H	H	H	h	O

La solution de sérine ainsi préparée ne paraît pas plus active que le produit dont nous avons séparé la globuline au pH 4,7. D'autre part le procédé y perd en précision : il est en effet difficile de débarrasser d'une façon absolue la solution de ses électrolytes et l'on ne peut jamais être certain d'avoir éliminé toute la globuline. La purification que nous cherchons est, dans ce cas, moins complète.

Des essais tentés jusqu'ici pour obtenir une sérine purifiée douée d'un pouvoir hémolytique, il est donc possible de conclure :

1°) On peut avec des procédés appropriés obtenir une sérine pure, sèche et possédant une activité hémolytique.

2°) Cependant cette activité diminue sensiblement au cours de la purification. La perte de pouvoir hémolytique paraît être liée en particulier à la séparation de la sérine et de la globuline.

2. — DIGESTION PEPSIQUE DE LA SERINE. ACTIVITE DES PRODUITS OBTENUS

Après avoir ainsi désintégré un sérum hémolytique pour

en obtenir la seule partie active, la sérine, il paraît intéressant de désintégrer à son tour cette sérine pour voir ce que devient alors le pouvoir hémolytique.

On sait que les matières albuminoïdes naturelles sous diverses influences donnent des substances albuminoïdes dites de transformation, de structure moléculaire moins compliquées, pour arriver à ces corps définis, amino-acides pour la plupart. C'est ainsi que l'albumine donnera par hydrolyse des syntonines, acide-albumine ou alcali-albumine suivant l'agent hydrolysant, acide ou base. Puis l'hydrolyse continuant, à l'aide de ferment, pepsine ou trypsine, nous arrivons aux albumoses et aux peptones qui représentent un stade de désintégration plus avancé.

Serait-il possible d'obtenir une matière albuminoïde de désintégration douée de pouvoir hémolytique ? Cette désintégration produit-elle la scission entre la substance hémolysante et son substratum biologique ? Dans ces deux cas la purification de l'hémolysine serait poussée plus avant, ou bien le nouveau traitement que nous nous proposons de faire subir à la sérine aurait-il pour effet de faire disparaître complètement une activité déjà très sensiblement diminuée ?

Pour résoudre ces questions on peut partir d'une solution de sérine hémolytique débarrassée de la globuline par acidification mais non précipitée.

A 5 cm³ de cette solution de sérine on ajoute 0 cm³ 15 d'acide chlorhydrique dilué du Codex (HCl au 1/10), 0 cm³ 25 d'une solution de pepsine 1 p. 100 (ce qui correspond à 0 gr. 0025 de pepsine) et 6 cm³ 60 d'eau distillée qui porte le mélange total à 11 cm³.

Le tout est porté 1/4 d'heure au bain-marie à 50°. Pendant ce temps très court avec cette faible quantité d'acide et de pepsine la protéolyse s'accomplit de façon très modérée et d'ailleurs très incomplète.

Pour arrêter l'action du ferment au temps marqué, on peut refroidir le mélange dans la glace et le neutraliser par la soude au 1/10 en présence de rouge de méthyle.

Cette neutralisation détermine un volumineux précipité d'acide-albumine dont le caractère essentiel est de n'être soluble qu'à la faveur de l'acide qui lui a donné naissance. Ce précipité est recueilli par centrifugation et décantation. Le liquide à peu près neutre (pH 7 environ) ne précipite plus par la soude même en excès et d'autre part coagule par la chaleur. On a donc encore en solution d'une part une matière albuminoïde non transformée puisque la soude a précipité l'acide-albumine, et, d'autre part les albumoses et les peptones, stade ultérieur de désintégration, ne précipitant pas par la chaleur. La technique d'hydrolyse se montre donc très douce, la fragilité de l'activité hémolytique l'exige.

Le précipité d'acide-albumine est repris par de l'eau acidulée au pH 4,9 et on effectue comparativement l'essai hémolytique du sérum initial, de la solution de sérine, de la solution d'acide-albumine et les albumines non transformées (tableau XV).

Tableau XV.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	Témoin
Valeur absolue	200 $\angle$	150 $\angle$	100 $\angle$	75 $\angle$	66 $\angle$	50 $\angle$	33 $\angle$	25 $\angle$	100 $\angle$
Titre	5	7,5	10	13	15	20	30	40	5
En 15 minutes :									
Sérum	H	h	h	O	O	O	O	O	O
Sérine	h	O	O	O	O	O	O	O	O
Acide albumine	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Albumine non transformée	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :									
Sérum	H	h	h	O	O	O	O	O	O
Sérine	h	h	h	O	O	O	O	O	O

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	Témoin
Valeur absolue	200 μ	150 μ	100 μ	75 μ	66 μ	50 μ	33 μ	25 μ	100 μ
Titre	5	7,5	10	13	15	20	30	40	5
Acide-albumine	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Albumine non transformée	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 45 minutes :									
Sérum	H	H	h	h	O	O	O	O	O
Sérine	h	h	h	O	O	O	O	O	O
Acide-albumine	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Albumine non transformée	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 1 heure :									
Sérum	H	H	H	H	h	h	O	O	O
Sérine	h	h	h	h	O	O	O	O	O
Acide-albumine	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Albumine non transformée	O	O	O	O	O	O	O	O	O
En 10 heures :									
Sérum	H	H	H	H	h	h	h	h	O
Sérine	H	H	H	h	h	h	O	O	O
Acide-albumine	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Albumine non transformée	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Le pouvoir hémolytique semble alors définitivement disparu. Encore une fois la purification s'est montrée préjudiciable à l'activité. Il semble donc qu'il faille se contenter de la sérine hémolytique précipitée par le chlorure de sodium, sans chercher par des purifications méthodiques à débarrasser l'hémolysine de son substratum qui paraît jouer un rôle actif dans la stabilité du pouvoir hémolytique.

3. — PURIFICATION DE L'HEMOLYSINE PAR LE CHLORURE DE LITHIUM

Les techniques qui, cherchant à purifier le principe actif d'un sérum hémolytique font une séparation méthodique des protéines du sérum, ne donnent que de médiocres résultats. On peut donc se demander s'il serait possible d'employer un procédé qui, sans tenir compte de la constitution du sérum, serait plus adapté à la nature instable de l'hémolysine.

Le sérum contient en pseudo-solution des matières protéiques pour une proportion de 70 à 80 p. 1.000 environ. Il renferme d'autre part des électrolytes en proportion de 8 p. 1.000, un peu de glucose et de faibles quantités de corps organiques comme l'urée, l'acide urique, etc...

Si d'un sérum hémolytique on réussit à éliminer successivement ces diverses catégories de corps, à commencer par les matières protéiques et si au lieu de chercher à entraîner dans nos précipités le principe hémolytique, on s'efforce de les maintenir dans le sérum que nous dépouillons peu à peu de ses constituants, nous aurons là un procédé de purification du sérum hémolytique étudié. A priori cette méthode peut paraître plus recommandable que les précédentes : en effet dans ce cas l'hémolysine ou son substratum ne serait pas touché tandis qu'en même temps s'élimineraient les impuretés.

Il faut donc d'abord trouver un réactif susceptible de précipiter les protéines sans entraîner l'activité hémolytique. Au cours d'essais, pratiqués d'ailleurs à une autre fin, le chlorure de lithium s'est montré dans certains cas remplir cette condition. On doit ensuite se débarrasser des autres constituants du sérum, des électrolytes principalement : nous avons pour cela songé à mettre à profit la dialyse telle qu'elle a déjà été employée.

1. — *Technique de précipitation.*

Les expériences suivantes nous montrent ce que l'on peut attendre du chlorure de lithium.

On commence par préparer une solution de chlorure de lithium à 75 p. 100 en pesant 75 grammes de chlorure de lithium cristallisé non déliquescent et en ajoutant de l'eau distillée jusqu'à un volume total de 100 cm³. On détermine ensuite successivement :

1° Les conditions optima de précipitation des protéines sériques par le chlorure de lithium.

2° Le pouvoir hémolytique des produits obtenus.

Comme dans le cas des précipitations au chlorure de sodium, on doit penser que la réaction du liquide à précipiter joue un rôle important. En effet, lorsque l'on part du sérum à l'état normal, c'est-à-dire présentant un pH 7 environ, la floculation ne commence que pour un volume de solution de chlorure de lithium à 75 p. 100 égal au volume de sérum employé. Le trouble produit ne se transforme en précipité pour aucune concentration de chlorure de lithium. Mais si l'on a soin avant d'ajouter le chlorure de lithium d'ajuster le sérum au pH 4,7 à l'aide d'acide acétique, l'addition de sel détermine alors un volumineux précipité.

Quelle quantité minima de sel doit-on employer pour produire une réaction aussi complète que possible ? Cette proportion sera déterminée par une précipitation fractionnée dans une série de quatre tubes à hémolyse. Chacun de ces tubes ont reçu un mélange de sérum et de solution de chlorure de lithium dans les proportions suivantes :

Tubes	Sérum	Solution de LiCl
1	1 cm ³	0,5cm ³ /10
2	1 cm ³	1cm ³ /10
3	1 cm ³	1,5cm ³ /10
4	1 cm ³	2cm ³ /10

Dans chacun de ces tubes il se produit un précipité. Pour en apprécier l'importance, on coagule par la chaleur la solution séparée par centrifugation. Les troubles produits dans chacune de ces solutions sont comparés par néphélémétrie. Très abondant dans le premier tube, le trouble diminuant dans le tube 2 et le tube 3, devient un trouble très léger dans le tube 4.

Le tube 4 où on admet donc que la précipitation est à peu près complète, contient le chlorure de lithium dans une proportion de 15 p. 100.

Il faut remarquer que dans la pratique il est préférable pour effectuer ces précipitations d'employer une solution de chlorure de lithium à 50 p. 100 qui donne un précipité moins cailléboté et, partant, moins adsorbant pour le sel que la solution à 75 p. 100.

Après avoir ainsi fixé les conditions optima de la précipitation, on peut étudier le pouvoir hémolytique des produits obtenus, précipité et solution.

On ajuste au pH 4,7 un sérum hémolytique. Puis par addition en quantité convenable d'une solution de chlorure de lithium à 50 p. 100 on charge le sérum de chlorure de lithium dans une proportion de 15 p. 100. Un précipité se produit que l'on recueille par centrifugation. Le liquide ne précipite plus par le réactif, preuve que la purification a été complète.

Le précipité est dissout dans quelques centimètres cubes d'eau légèrement alcalinisée puis cette solution de protéines est mise à dialyser rapidement contre une grande masse d'eau.

Au cours de cette dialyse le liquide se trouble à nouveau : le précipité n'est donc pas soluble dans l'eau pure ce qui nous permet de conclure qu'on se trouve en présence de globuline.

La partie du sérum non précipitée coagule quand on la porte à ébullition. Dialysée dans les mêmes conditions que

le précipité remis en solution, elle reste limpide. Avec le sulfate de magnésium on obtient, après dialyse, un très léger louche, dû probablement à la présence de traces de globuline mal éliminée. On peut donc admettre que l'on se trouve en présence d'une solution de sérine plus ou moins pure.

2. — *Activité hémolytique des produits obtenus.*

Un essai hémolytique comparé est effectué sur le sérum et sur la solution de protéines.

Alors que le sérum hémolytique a un taux normal, la solution de protéines est complètement inactive : on laisse l'expérience se poursuivre une vingtaine d'heures et on ne constate pas de variation dans ce résultat négatif.

La fraction du sérum ne précipitant pas par le chlorure de lithium possède-t-elle une activité hémolytique quelconque ? On dialyse le liquide afin de le débarrasser de l'excès de chlorure de lithium. Puis on en fait l'essai hémolytique en comparaison avec la solution de protéines. La fraction du sérum ne précipitant pas par le chlorure de lithium se montre hémolytique alors que les essais négatifs persistent avec les protéines.

Voici d'ailleurs quelques exemples d'hémolyses ainsi obtenues (tableau XVI) :

Tableau XVI.

TUBES	1	2	3	4	5	6	Témoin
Valeur absolue	100 /	75 /	66 /	50 /	33 /	25 /	100 /
Titre	10	13	15	20	30	40	10
En 15 minutes :							
Protéines précipitées	O	O	O	O	O	O	O
Solution 1	O	O	O	O	O	O	O
Solution 2	h	O	O	O	O	O	O
Solution 3	h	O	O	O	O	O	O
En 30 minutes :							
Protéines précipitées	O	O	O	O	O	O	O
Solution 1	h	h	O	O	O	O	O
Solution 2	h	h	O	O	O	O	O
Solution 3	h	h	h	h	O	O	O
En 45 minutes :							
Protéines précipitées	O	O	O	O	O	O	O
Solution 1	H	h	h	h	O	O	O
Solution 2	H	h	h	h	O	O	O
Solution 3	H	H	h	h	h	O	O
En 1 heure :							
Protéines précipitées	O	O	O	O	O	O	O
Solution 1	H	H	h	h	h	O	O
Solution 2	H	H	h	h	h	O	O
Solution 3	H	H	h	h	h	h	O

Le traitement de chlorure de lithium à 15 p. 100 peut donc constituer un mode de purification du sérum hémolytique. Toutefois cette purification, comme toutes celles que nous avons étudiées jusqu'ici, ne se fait pas sans une diminution assez considérable du pouvoir hémolytique du sérum. On compare l'activité du sérum initial et celle du même sérum après traitement au chlorure de lithium dans les conditions

indiquées plus haut. Nous avons obtenu les résultats suivants que nous avons comparés à ceux obtenus avec le précipité acétonique du même sérum (tableau XVII).

Tableau XVII.

TUBES	1	2	3	4	5	6	Témoin
Valeur absolue	100 $\angle$	75 $\angle$	66 $\angle$	30 $\angle$	33 $\angle$	25 $\angle$	100 $\angle$
Titre	10	13	15	20	30	40	10
En 15 minutes :							
Sérum initial	H	H	H	H	h	h	O
Sérum traité au LiCl	H	h	h	h	h	O	O
Précipité acétonique	H	H	h	h	h	O	O
En 30 minutes :							
Sérum initial	H	H	H	H	H	h	O
Sérum traité au LiCl	H	H	h	h	h	h	O
Précipité acétonique	H	H	H	H	h	O	O
En 45 minutes :							
Sérum initial	H	H	H	H	H	h	O
Sérum traité au LiCl	H	H	H	h	h	h	O
Précipité acétonique	H	H	H	H	h	h	O
En 1 heure :							
Sérum initial	H	H	H	H	H	H	O
Sérum traité au LiCl	H	H	H	H	h	h	O
Précipité acétonique	H	H	H	H	H	h	O
En 1 h. 15 m. :							
Sérum initial	H	H	H	H	H	H	O
Sérum traité au LiCl	H	H	H	H	H	h	O
Précipité acétonique	H	H	H	H	H	h	O

La purification au chlorure de lithium ne respecte donc pas complètement le pouvoir hémolytique. Au contraire l'activité semble être sensiblement plus diminuée que si l'on s'adresse à la méthode de l'acétone.

D'autre part on peut faire un essai systématique et comparatif sur le sérum initial;

sur le précipité au chlorure de lithium, dialysé et sur son eau de dialyse;

sur la partie du sérum ne précipitant pas et dialysée.

Les mêmes résultats sont obtenus, l'activité hémolytique ne passant pas dans le précipité et restant en solution. Ce procédé, combinant l'action du chlorure de lithium et de la dialyse permet d'obtenir un sérum purifié. Les impuretés les plus gênantes pour les anticorps sont toujours les matières protéiques, or, le chlorure de lithium paraît ici en éliminer la plus grande partie. Quant aux impuretés salines une dialyse convenablement effectuée les élimine.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail nous avons cherché à purifier les hémolysines, c'est-à-dire à fixer une activité hémolytique maxima sur un minimum de substance protéique; il nous a donc fallu précipiter les substances protéiques d'un sérum hémolytique. Pour cela nous avons successivement employé l'acétone, le chlorure de sodium et le chlorure de lithium.

I. — *Précipitation acétonique.*

1° La substance protéique qui dans un sérum retient l'activité hémolytique est la sérine. Cette sérine est isolée par précipitation des protéines totales par la méthode à l'acétone telle que Fournier l'a employée en 1915 et que Piettre a appliquée. De ces protéines totales la globuline est éliminée par acidification au pH 5,4 en l'absence d'électrolytes. Cette globuline est dépourvue d'hémolysine qui est localisée dans la solution de sérine.

2° Il y a une perte sensible d'activité hémolytique entre le sérum et la solution de sérine ainsi obtenue. Cette perte dépend du temps de contact des substances hémolytiques avec le sérum et la température à laquelle se fait la précipitation. Cette réaction doit s'accomplir à 0° et dans le minimum de temps (une vingtaine de minutes).

3° Même dans ces conditions la perte d'activité est sensible.

Pour un volume donné d'hématies le titre de sérum hémolytique sera la fraction de ce volume qui hémolysera complètement les hématies. La différence entre le titre du sérum et le titre de la solution de sérine nous donnera la

perte d'activité. A l'aide d'une échelle de dilutions croissantes et suffisamment rapprochées cette perte peut être évaluée à 30 p. 100 environ.

4° Peut-on obtenir de la sérine hémolytique à l'état sec et pulvérulent ?

La précipitation acétonique conduite rapidement et à 0° donne un produit anhydre mais complètement inactif.

La dessiccation dans le vide profond donne une sérine en lamelles douée de pouvoir hémolytique.

Il n'y a pas de perte entre l'activité de cette sérine et celle des protéines totales.

II. — *Précipitation par le chlorure de sodium.*

1° Une solution de sérine isolée d'un sérum hémolytique par la méthode à l'acétone et l'acidification au pH 5,3 est portée au pH 4,6. On ajoute à cette solution du chlorure de sodium pur dans une proportion de 25 p. 100 environ. La sérine précipite alors, on peut la recueillir par centrifugation.

2° Cette sérine remise en solution est dialysée aussi rapidement que possible à travers une membrane de cellophane. Une telle opération ne modifie aucunement le pouvoir hémolytique.

3° La solution de sérine ainsi débarrassée du chlorure de sodium est hémolytique.

Il n'y a pas de perte d'activité entre cette solution de sérine et la solution de protéines totales.

4° Il ne paraît pas possible de pousser plus loin le fractionnement protéinique sans achever de faire disparaître l'activité hémolytique. Une digestion pepsique de la sérine hémolytique ne donne que des produits complètement inactifs.

III. — *Précipitation à l'aide du chlorure de lithium.*

Ayant constaté que la méthode à l'acétone occasionne une perte très sensible du pouvoir hémolytique, perte qu'un traitement ultérieur ne paraît pas accentuer, on peut se demander s'il est possible sans employer l'acétone d'obtenir un rendement plus intéressant. Si l'on traite un sérum hémolytique par une solution de chlorure de lithium dans une proportion de 15 pour cent on arrive aux conclusions suivantes :

1° Ce procédé ne permet pas de séparer exactement la sérine de la globuline.

2° Le pouvoir hémolytique est localisé dans la partie du sérum ne précipitant pas. Le précipité est inactif.

3° Le sérum hémolytique débarrassé d'une partie de ses matières protéiques par le chlorure de lithium perd de ce fait une partie de son activité. Dans ce cas la perte peut encore être évaluée à 30 p. 100 environ.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,

TASSILLY.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,

RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

Causes de l'Hémolyse	15
Mécanisme de l'Hémolyse	16
Essais de localisation du pouvoir hémolytique d'un sérum	18

TECHNIQUE D'HÉMOLYSE

MARCHE DU PHÉNOMÈNE

Technique d'Hémolyse	25
Allure générale du phénomène	31

ESSAI DE CONCENTRATION DE L'ACTIVITÉ HÉMO- LYTIQUE PAR LA MÉTHODE A L'ACÉTONE

Précipitation acétonique des protéines du sérum	35
Pouvoir hémolytique des protéines totales obtenues par la méthode à l'acétone	38
Séparation de la globuline et de la sérine. Étude de leur activité hémolytique	45
Essais tentés pour obtenir une sérine sèche hémolytique à partir de la méthode à l'acétone	48

ESSAI DE CONCENTRATION DE L'ACTIVITÉ HÉMO- LYTIQUE PAR PRÉCIPITATION PAR QUELQUES ÉLECTROLYTES AU POINT ISOÉLECTRIQUE

Technique de la précipitation par le chlorure de sodium	57
Action de la dialyse sur un produit hémolytique	61
Digestion pepsique de la sérine. Activité des produits obtenus	66
Purification de l'hémolysine par le chlorure de lithium ..	70
Technique de la précipitation	71
Activité hémolytique des produits obtenus	73
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	77

BIBLIOGRAPHIE

1. — FABRE ET SIMONNET : *Ann. de Physiol. et de Physico-Chim. Biol.*, III, 389, 1926.
2. — FABRE : *Journ. de Pharm. et de Chim.* (8), IV, 385, 1926.
3. — FABRE : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, X, 1306, 1928.
4. — BORDET : *Traité de l'Immunité*, 528-548, 1920, Masson.
5. — ERHLICH : *Deutsch. Méd. Wochenschrift* XXIV, 597-600, 1898.
6. — BORDET : *Ann. Inst. Pasteur*, XV, 161, 1903.
7. — DANYSZ : *Ann. Inst. Pasteur*, XVI, 331, 1902.
8. — FABRE ET SIMONNET : *G. R. Ac. Sc.*, CXXCVII, 1574, 1928.
9. — PIETTRE ET VILA : *Bull. de la Société Centrale de Médecine Vétérinaire*, LX, 296, 1906.
10. — PIETTRE ET CHRÉTIEN : *Etude Biochimique de l'Hémolyse*, éd. de la Rev. de Path. comp., 40, 1927.
11. — J. LOEB : *Les Protéines*, traduction de H. Mouton, 9, 1924, Félix Alcan.
12. — RIENER : *Bioch. Zeitschr.* CXCI, 165, 1927.
13. — SORENSSEN : *C. R. des trav. du Lab. Carlsberg*, 11, 15, 1925.
14. — PIETTRE : *Archivos do Instituto Vital Brazil* 1, 1, 1923.

15. — FROUIN : *C. R. Soc. Biol.*, LXV, 444, 1908.
16. — LIEBERMANN ET VON FENYVESSY : *Centralbl. für Bakteri-
riol.*, XLVII, 274, 1908.
17. — WATSON ET WALLACE : *Journ. of Pathol. and Bact.*,
XXVII, 271, 1924.
18. — SEDALLIAN ET Mlle GAUMOND : *C. R. Soc. Biol.*,
XCVII, 93, 1927.
19. — LEULIER, SEDALLIAN ET MME CLAVEL : *Bull. Soc.
Chim. Biol.*, XI, 415, 1929.
20. — FOURNIER : *Les matières grasses du sang*, p. 118,
1915, Vigot.
21. — PLÉ : *Contribution à l'étude de la purification de la
pepsine par application de ses propriétés physico-
chimiques*. Thèse Doct. Un. (Pharm.), Paris, 1929.
22. — FABRE : *Journ. de Pharm. et de Chim.*, (8) IV, 247,
1926.
23. — FABRE ET SIMONNET : *Ann. de Physiol. et de Physico-
Chim. Biol.*, III, 389, 1926.
24. — MAYER ET SCHAEFFER : *Journ. de Physiol. et Pathol.
gén.*, XVI, 128, 1914.
25. — PIETTRE ET CHRÉTIEN : *Etude biochimique de l'Hé-
molyse*. Edition de la Rev. de Pathol. comp., p. 18,
1927.
26. — CLARK : *The determination of Hydrogen ions*, 2^e éd.
1925, Baltimore, Williams and Wilkins C^o.
27. — ERHLICH ET SACKS : *Berlin, Klin, Wochen*, 14, 1902.
28. — MICHAELIS ET SKWIRSKY : *Zeit. f. Immun.*, IV, 374,
1910.

29. — PIETTRE ET CHRÉTIEN : *Etude Biochimique de l'Hémolyse*. Edition de la Rev. de Pathol. comp., 48, 1927.
30. — PIETTRE ET CHRÉTIEN : Idem.
31. — PIETTRE ET CHRÉTIEN : *Etude biochimique de l'Hémolyse*. Edition de la Rev. de Pathol. comp., 19, 1927.
32. — PLÉ : *Contribution à l'étude de la purification de la pepsine par applications de ses propriétés physico-chimiques*. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), p. 39, Paris, 1929.
33. — BERGAUER : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, X, 576, 1928.
34. — ROUX ET YERSIN : *Ann. Inst. Pasteur*, II, 629-661, 1888.
35. — ROUX ET YERSIN : *Ann. Inst. Pasteur*, III, 273-288, 1889.
36. — LEULLIER, SEDALLIAN, MME CLAVEL : *Bull. Soc. Chim., Biol.* XI, 418, 1929.
-

ACHEVÉ D'IMPRIMER
LE 1^{er} MARS 1930
PAR
L'IMPRIMERIE DE COMPIÈGNE
(OISE).

